PUFFMUSTER UND RNA-SYNTHESE LARVALER DROSOPHILA MELANOGASTER SPEICHELDRÜSEN IN VITRO

TAGESRHYTHMISCHE RNA-SYNTHESE IN DEN PUFFS LARVALER DROSOPHILA MELANOGASTER SPEICHELDRÜSEN IN VITRO

D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Günther Nagel
aus Hildesheim

Göttingen 1973

PUFFMUSTER UND RNA-SYNTHESE LARVALER DROSOPHILA MELANOGASTER SPEICHELDRÜSEN IN VITRO

TAGESRHYTHMISCHE RNA-SYNTHESE IN DEN PUFFS LARVALER DROSOPHILA MELANOGASTER SPEICHELDRÜSEN IN VITRO

D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Günther Nagel
aus Hildesheim

Göttingen 1973

D 7

Referent: Prof. Dr. L. Rensing
Korreferent: Prof. Dr. G. Birukow
Tag der mündlichen Prüfung: 1.11.82

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

TEIL I

PUFFMUSTER UND RNA-SYNTHESE LARVALER DROSOPHILA MELANOGASTER SPEICHELDRÜSEN IN VITRO

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534919_0073

Inhaltsverzeichnis

Teil I Puffmuster und RNA-Synthese larvaler Drosophila melanogaster Speicheldrüsen in vitro

Einleitung 1

A. Material und Methoden 3
1. Stamm und Präparation
2. Medium
3. Puffbestimmung
4. Autoradiographie
5. Auswertung der Autoradiogramme
6. Puffinduktion

B. Ergebnisse 9
1. Puffmuster
2. Hitzeschocks
3. Puromycin
4. Cycloheximid
5. α-Amanitin

C. Diskussion 21

D. Zusammenfassung 30

E. Literaturverzeichnis 32

Teil II Tagesrhythmische RNA-Synthese in den Puffs larvaler Drosophila melanogaster Speicheldrüsen in vitro

Einleitung 1

A. Material und Methoden 3
1. Stamm und Präparation
2. Medium
3. Kerndurchmesser
4. Puffbestimmung
5. Puffquotient (PQ)
6. Autoradiographie

B. Ergebnisse 4
1. Kerngröße
2. Puffgröße
3. RNA-Markierung
C. Diskussion 21
D. Zusammenfassung 27
E. Literaturverzeichnis 28

Einleitung

Die grundlegenden Mechanismen von Transcription und Translation sind anhand einfacher procaryotischer Systeme geklärt worden. Entsprechende Untersuchungen an eucaryoten Zellen sind jedoch wegen ihrer größeren Komplexität sehr schwierig. Deshalb ist es notwendig, solche Zellen zu untersuchen, die gewisse Vorzüge gegenüber einem normalen eucaryotischen System aufweisen. In diesem Zusammenhang erlangten polytäne Chromosomen bestimmter Gewebezellen eine besondere Bedeutung, handelt es sich doch um Interphasechromosomen, deren genetische Aktivität sich im lichtoptischen Bereich verfolgen läßt (BEERMANN, 1956). Ihre Genloci zeigen im Verlaufe der Entwicklung bestimmte, sich kontinuierlich verändernde Aktivitätsmuster (BECKER, 1959 ; ASHBURNER, Zusf.1972). Diese Informationsrealisierung erfolgt in den sogenannten Puffs, die auf Grund einer lokalen Entspiralisierung der DNA, der Einlagerung von sauren Proteinen einschließlich der RNA-Polymerase und der dort ablaufenden RNA-Synthese anschwellen (PELLING, 1964). Wahrscheinlich spielt auch das Verbleiben der dort synthetisierten RNA eine gewisse Rolle bei der Volumensvergrößerung (BERENDES, 1969).

Um übergeordnete Systeme wie etwa das Hormonsystem bei Untersuchungen über Mechanismen der intrazellulären Regulation der Puffaktivität (etwa Aktivierungsmechanismen und tagesrhythmische RNA- Synthese) auszuschalten, ist es notwendig, solche Gewebe zu isolieren. In der vorliegenden Arbeit wur-

de daher versucht, larvale Speicheldrüsen von Drosophila melanogaster nach der Isolierung für längere Zeit in vitro am Leben zu erhalten. Die Auswirkung einer solchen " Kultur " auf das Puffmuster der Drüsen und die damit verbundene RNA-Synthese wurde untersucht. Gleichzeitig wurde die seit längerer Zeit bekannte Reaktion der Speicheldrüsenzellen auf Hitzeschocks (RITOSSA, 1962 und 1963) getestet, um sicherzugehen, daß das Medium die in vivo Lebensbedingungen sinnvoll imitiert. Da der Prozeß der Puffaktivierung von basischen und sauren Proteinen abhängig ist (DESAI und TENCER, 1968 ; BERENDES, Zusf. 1971), interessierte auch die Reaktion des Puffmusters auf Eingriffe in den Proteinstoffwechsel, der mit Puromycin und Cycloheximid blockiert wurde (siehe auch SCHOON und RENSING, 1973).Schließlich wurde der Versuch unternommen, die Einflüsse eines RNA- Synthesehemmers (α-Amanitin, WIELAND, Zusf.1972) auf die RNA-Synthese und die Puffinduktion festzustellen.

A. Material und Methoden

1. Stamm und Präparation

Für die Versuche wurde ein Wildstamm von Drosophila melanogaster Meigen verwendet, dessen Herkunft und Haltungsbedingungen (David Medium, 9^{00} bis 21^{00} Licht-Dunkel-Wechsel bei 200 Lux und $25^{\circ}C$) bei RENSING (1966a und b) beschrieben wurden. Die Speicheldrüsen wurden in der Wanderphase der Larven zwischen 9-11^{00} Uhr isoliert. Anschließend wurden sie auf einem Wachsringobjektträger in einer feuchten Petrischale in einem Nährmedium inkubiert. Das Medium wurde gegen 18^{00} Uhr und je nach Versuch an den darauf folgenden Tagen gegen 9^{00} und 18^{00} Uhr gewechselt. Vorher wurde das Medium durch einminütiges kräftiges Durchperlen der Lösung mit Carbogen angereichert.

Die Larven wurden in der üblichen Art und Weise, aber von der Ventralseite her, aufpräpariert. Bei dieser Arbeitsweise lassen sich mehr unbeschädigte Drüsen gewinnen. Das Gehirn wurde entfernt. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden speziell Drüsen der 115 Std nach Eiablage (PS 5-7, ASHBURNER, 1972) verwendet. Solche Drüsen sind an der Aufweitung des Drüsenlumens auf Grund der stärkeren Sekretion erkennbar. Die Quetschpräparate dieser Drüsen wurden nach NICOLETTI (1959) aufgearbeitet.

2. Medium

Ein bereits benutztes Medium (NAGEL und RENSING, 1971)

wurde zur Verbesserung der Haltungsbedingungen stark verändert. Die Nährlösung wurde aus zwei Stammlösungen, die 3-4 Tage im Kühlschrank aufbewahrt werden können, angesetzt.

Zur Stammlösung 1 (58ml H_2O_{dest}) gehören :

Serie a	NaH_2PO_4	326mg	Serie b	α-Ketoglutarsäure	35mg
	K_2HPO_4	226mg		Bernsteinsäure	6mg
	KCl	20mg		Glutaminsäure	70mg
	$NaHCO_3$	93mg		Asparaginsäure	20mg
				Fumarsäure	6mg
				Hefeextrakt	70mg
				Edamin	200mg

Serie c	Tyrosin	15mg	Threonin	36mg
	Methionin	10,5mg	Lysin	180mg
	Cystein	10mg	Arginin	22mg
	Tryptophan	10mg	Histidin	70mg
	Prolin	48mg	Asparagin	35mg
	Leucin	10mg	Glutamin	180mg
	Valin	22mg	Serin	50mg
	Alanin	48mg	Penicillin	6mg
	Glycin	47mg	Streptomycin	10mg

Bei der Herstellung dieser Stammlösung werden die Reagentien der Serie b in 30ml, die der Serie c in 28ml Wasser durch Schütteln gelöst. Nach Auflösung der Substanzen werden beide Lösungen zusammen- und die Salze a dazugegeben.

Zur Stammlösung 2 (58 ml H_2O_{dest}) gehören :

Serie a	$CaCl_2(2H_2O)$	122mg	Serie b	Penicillin	6mg
	$MgCl_2(6H_2O)$	142mg		Streptomycin	10mg
	$MgSO_4(7H_2O)$	370mg		Ascorbinsäure	10mg
				Glucose	100mg
				Saccharose	100mg
				Trehalose	1100mg

In diesem Fall werden die Substanzen der Serie b in 58ml Wasser gelöst und dann die Salze der Serie a in der oben angegebenen Reihenfolge einzeln dazugegeben. So kann vermieden werden, daß Ca^{2+} ausfällt.

Die Nährlösung kann dann kurz vor dem Versuch zu gleichen Teilen aus den beiden Stammlösungen hergestellt werden. Die endgültige Lösung besitzt dann einen pH von etwa 6.3 . Bei diesem pH lassen sich die Drüsen der Stadien (PS) 5-7 und höher recht gut " kultivieren " . Der pH-Wert sollte eingehalten werden, da bei zu hohem pH Magnesium-Salze einen Teil der gelösten Substanzen mitfällen. Vor dem Gebrauch wurde das Medium mit Stickstoff (1.5 atm) durch einen Seitz-Bakterienfilter filtriert.

Werden die Drüsen unbeschädigt isoliert, bleiben sie etwa eine Woche am Leben. Das Cytoplasma bleibt durchsichtig (absterbendes Cytoplasma koaguliert und wird opak); die Chromosomen sind gut quetschbar und zeigen ein eindeutiges Bandenmuster (RENSING, 1969). Die Histolyse unterbleibt in der Regel. Allerdings weisen Drüsen des PS 9 sehr oft (auch schon bei der Präparation) eine Vakuolisierung der Zellen, ein Zerreißen der Zellwände, Verklumpung der Chromosomen und einen deutlichen Hof um diesen Klumpen auf (Kern wird aufgetrieben), nach DEMEREC (1950) ein typisches Zeichen der Histolyse.

3. Puffbestimmung

Die Puffmuster und Puffloci wurden nach Arbeiten von BRID-

GES und BREHME (1944) und ASHBURNER (1967a, 1969a, Zusf. 1972) bestimmt.

4. Autoradiographie

Die Methode wure nach PELLING (1964) modifiziert. Der Nachweis der RNA-Synthese wurde durch Zusatz von ^{3}H-Uridin (spez. Aktivität 24 Curie/mMol ; Zusatz von 10 µC/ml Medium) zum Medium geführt. Die Drüsen wurden für eine Std in diesem Medium inkubiert (25°C) und anschließend zweimal in kaltem Medium gewaschen (jeweils 5 min). Danach wurden sie mit 50%tigem Eisessig fixiert (5min) und mit einer Karminorcein-Essigsäurelsg gefärbt (etwa 15-30min). Auf einem Chrom-Alaun-Objektträger wurden diese Drüsen dann in 50%tigem Eisessig sorgfältig zerrupft, das Sekret entfernt und dann gequetscht. Nach Bestimmung des Puffmusterstadiums wurden nun nach Trockeneisbehandlung (5min) die Deckgläschen abgesprengt und die Drüsen zur kurzfristigen Aufbewahrung in eine Formaldehyd-Äthanol-Lösung (9:1) überführt. Zum Strippen wurden die Präparate für 5min in abs. Alkohol und dann für 30 min in H_2O_{dest} gebracht. Für die Autoradiographien wurden Kodak Platten (AR 10) benutzt. Gestrippt wurde bei 60-65% Luftfeuchtigkeit in einem Wasserbad von 30°C. Nach Trocknung wurden die Präparate für eine Woche bei 4°C exponiert und schließlich in der vorgeschriebenen Weise entwickelt. Diese Präparate überführte ich dann für 5 min in ein Wasserbad, anschließend für 3-4 min in 70%tigen Alkohol und färbte sie dann in einer o.25%tigen Toluidin-

blaulsg (30sec), bis das Präparat eine einheitliche rosa-violette Färbung aufwies. Nach Trocknung wurden die Präparate ohne weitere Behandlung mit Entellan (Merck, Darmstadt) eingebettet.

5. Auswertung der Autoradiogramme

Die Auswertung erfolgte unter dem Mikroskop. Der unterschiedliche Background der Präparate und über den Chromosomen zwint zur Einführung eines Korrekturfaktors, will man die Markierung der einzelnen Puffs miteinander vergleichen. Nach Auszählen der Grains über den Puffs wurde daher einmal der Background des Präparates (def.Fläche) und zum anderen die Gesamtmarkierung über dem Chromosomenabschnitt 58A-60F (2R) festgestellt. Dann wurde jeweils in jeder Me serie je Tageszeit das Mittel der beiden Markierungsdicht bestimmt und als Bezugswert festgelegt. Die Abweichungen des Präparat-Backgrounds vom Mittel wurden entsprechend Puffläche der untersuchten Puffs zur Korrektur der Puffmarkierung verwendet. Die Variation der Markierung über Chromosomen (festgestellt über 58A-60F) einer Messerie wurde dadurch ausgeglichen, daß in jedem Präparat die Abweichung vom Bezugswert in Prozent in positiven oder negativen Sinne mit der Markierungsdichte über den Puffs dies Präparates verrechnet wird. Ist x der definierte Bezu sw einer Messerie über 58A-60F und x_a die in einem Präpar gefundene Abweichung von diesem Mittelwert, so ist die

weichung a in % : $a = \frac{x_a \cdot 100}{x}$ % .

Dies gilt dann auch für die übrigen Markierungswerte der anderen Puffs, da auch in der Region 58A-60F Puffs liegen. Damit ergibt sich für die gemessenen Werte y der Puffs der Korrekturwert $y_K = \frac{y}{a} 100$. Dieser korrigierte Wert ging dann in die Berechnung des AQ-Wertes (Autoradiographiequotient) ein, der Unterschiede im Quetschungsgrad und Polytäniegrad ausgleichen soll. Hierbei wurde die Grainzahl über einem Puff durch den Durchmsser einer definierten Bezugsbande B in der Nähe des jeweiligen Puffs dividiert : $AQ = \frac{y_K}{B}$. Zur Bestimmung des AQ eines Puffs wurden 5 Chromosomensätze je Drüse ausgewertet und das Mittel dieser Werte für jeden Puff wurde einer Messerie zugeordnet (etwa 2o-30 Werte), deren Median und Konfidenzintervall ($c_{95\%} = x\sqrt{\frac{N}{4}}$) bestimmt wurde (E. WEBER, 1956;S. 420).

6. Puffinduktion

Getestet wurde die Reaktion der Speicheldrüsenzellen auf kurzfristige Erwärmung, indem die"Kulturobjektträger" für 5 min auf einen wärmeregulierbaren Strecktisch (37°C) gebracht wurden. Zur Beurteilung der Puffinduktion wurden die erzielten Puffs nach 4 Größenklassen geordnet (1=schwach; 2=mittel; 3=stark; 4=maximal).

Weitere Versuche wurden mit Puromycin und α-Amanitin gemacht, die je nach Versuch dem Medium in bestimmten Konzentrationen zugesetzt wurden. In diesen Fällen und für Cycloheximid wurden zur Kontrolle der RNA-Synthese Autoradiographien angefer-

tigt.

Puromycin und Cycloheximid (Serva,Heidelberg) und α-Amanitin (Böhringer,Mannheim) wurden in Stammlösungen angesetzt und im Gefrierfach aufbewahrt.

B. Ergebnisse

1. Puffmuster

Die Speicheldrüsen von Larven der Wanderphase wurden zwischen 9^{00} und 11^{00} Uhr isoliert. Die eine Hälfte der Drüse wurde sofort fixiert, gefärbt und gequetscht. Die andere verblieb 24 Std im Medium und wurde dann in gleicher Weise aufgearbeitet. Es wurden folgende Puffs miteinander verglichen : 21F (2L); 58DE, 58BC, 47BC, 47A (2R); 62E, 63E, 63F, 74EF, 75B (3L); 98F und 8F (3R). Es ergab sich, daß sich das Muster bis auf wenige Ausnahmen im allgemeinen nicht veränderte. Daraus folgt, daß mit dem Zeitpunkt der Präparation die Puffmusterentwicklung zum Stillstand kommt. In einigen Fällen traten innerhalb einer Drüse unterschiedliche Puffmusterstadien auf; es handelte sich um die Stadien PS6 und PS 8. Es hat den Anschein, als ob bei einigen Kernen das Muster noch nicht hinreichend manifest ist, so daß es auf eine frühere Entwicklungsstufe zurückfällt. Eine andere Möglichkeit ist, daß einige Kerne noch in der Lage sind, ihre Muster weiterzuentwickeln, während bei den restlichen [illegible] Entwicklung vollständig blockiert ist. In einer Drüse

wertig.

Als Reaktion auf die Inkubation tritt bei einer Anzahl von Puffs eine Größenreduktion auf. Betroffen sind vor allem die großen Puffs wie 78D, 75B, 74EF, 72D, 71DE, 63E, 21F, 23E, 47BC, 47A und 98F. Trotzdem sind die vorgefundenen Muster eindeutig bestimmten Stadien der Puffmustergeschichte zuzuordnen. So bleiben die Doppelpuffs 58DE/BC und 74EF/75B, ebenso etwa sehr phasenspezifische Puffs wie 62E, 63E, 71DE, 72D, 78D, 98F, 85F, 21F, 22C, 23E, 2B13-17 und 2B5-6. Ganz allgemein gilt jedoch, daß sich nach der Inkubation niemals so große Puffs wie sie in vivo vorkommen nachweisen lassen. Zudem treten neue Puffs auf : 87A, 87B, 63BC, 64F, 67B, 95D, 70A, 33B und 84E, 85B, häufig auch 57DE. Allerdings variiert ihre Größe und in vielen Präparaten ließen sich die " hitzeinduzierbaren Puffs " (RITOSSA, 1962) nur in begrenztem Ausmaß oder gar nicht nachweisen. Grundsätzlich scheinen diese Puffs im Medium etwa nach 7-8 Std aufzutreten. Einige Experimente, die 6 Std nach Präperation durchgeführt wurden, zeigten, daß sich dieses Bild 30min nach einer starken Sauerstoffanreicherung des Mediums nicht änderte. Sauerstoffmangel scheint also nicht die Ursache zu sein. Da zudem eine Erwärmung während der Präparation und Inkubation sorgfältigst vermieden wurde, scheidet die Hitzeinduktion als Ursache für das Auftreten dieser Puffs aus.

Die Auswertung der Autoradiographien der Puffmusterstadien

5-7 (etwa um die 115 Std nach Eiablage; 1-24 stündige Inkubation im Medium, dann 1 Std vor dem Quetschen Inkubation in ^{3}H-Uridin; Präperation der Drüsen stets zwischen 9 und 10 Uhr) bestätigte diese Befunde. Es ließ sich in folgenden Puffs und Chromosomenregionen ein Einbau von ^{3}H-Uridin nachweisen :

2L : 21F, 22C, 23E, 29F, 33B, 33E, 34A. Die Spitze des Chromosoms war häufig markiert. Ein Puff in 25AC und 38B baute nur gelegentlich Uridin ein.

2R : 59F, 58DE, 58BC, 55E, 50CE, 48B, 47BC, 47A, 46F, 46A, 44AB, 43E, 42A. Häufiger waren Puffs in den Regionen 57DE, 56AB, 56DE, 55B und die Spitze des Chromosoms markiert. Ein Einbau in die Regionen 60F, 54F, 53CD, 50AB, 50F, 49EF, 45AB und 45E war nur selten nachweisbar.

3L : 62E, 63BC, 63F, 64F, 66B, 66E, 67B, 68C, 70C, 71DE,72D, 74EF, 75B, 78D, wahrscheinlich aber auch in 79EF. Häufiger waren folgende Loci markiert : 64B und 76AB, selten dagegen 61C, 67F, 69A, 73B, 75CD, 76D und 77EF. Auch hier zeigte die Spitze des Chromosoms sehr oft eine stärkere Markierung.

3R : 99B, 98F, 96E, 95F, 95D, 95B, 93D, 90BC, 88B, 88EF, 88D, 87A, 87B, 85F, 85D, 85B, 84E, 83E und 82F. Hierzu gehört wahrscheinlich auch 82CD. 93E war häufiger markiert.

X : Hier untersuchte ich nur die Spitze des Chromosoms,

wobei Aktivitäten in den Regionen 2B5-6, 2B13-17, 2EF und 2A auftraten.

Einige Puffs sind auf Grund der diffusen Chromosomenmarkierung schlecht nachweisbar : 61C, 62A, 64B, 65BC, 93E, 49E, 50AB, 57CD, 60B, 21C, 22B4-5 und 25AC. Eine noch locus-spezifischere Markierung der Chromosomen dürfte daher noch mehr Aktivitäten in kleineren Genloci aufzeigen.

Bei der Auswertung der Autoradiogramme ergaben sich außerdem interessante Einzelbefunde. So ist der Einbau in einen Puff um so stärker, je größer er ausgebildet ist (Abb.1). Es gibt aber Ausnahmen. In manchen Fällen zeigten gut entwickelte Puffregionen ganzer Chromosomensätze oder auch einzelne Puffs keinen oder einen verhältnismäßig geringen Einbau (Artefakt?). Im Falle der Puffs 74EF und 75B ergab sich zudem, daß 74EF trotz nahezu gleicher Größe einen in fast allen Fällen wesentlich geringeren Einbau aufweist. Dagegen traten mehrere Fälle gleichwertigen Einbaus in Puffs extrem dünner Chromosomen auf, die wesentlich kleiner waren als die der normalen Kerne der gleichen Drüse. Weiterhin sind in einer Drüse schwach, mittel und stark einbauende Chromosomensätze nachweisbar. Bei schwacher Markierung sind nur die Puffs markiert. Die stark markierten Chromosomensätze konnten nicht ausgewertet werden (siehe hierzu PROBECK und RENSING, 1973). War die Gesamtmarkierung des Chromosoms stark, waren auch die Puffs übernormal markiert. Grundsätzlich war aber die Markierung der Kerne einer Drü-

Abbildung 1

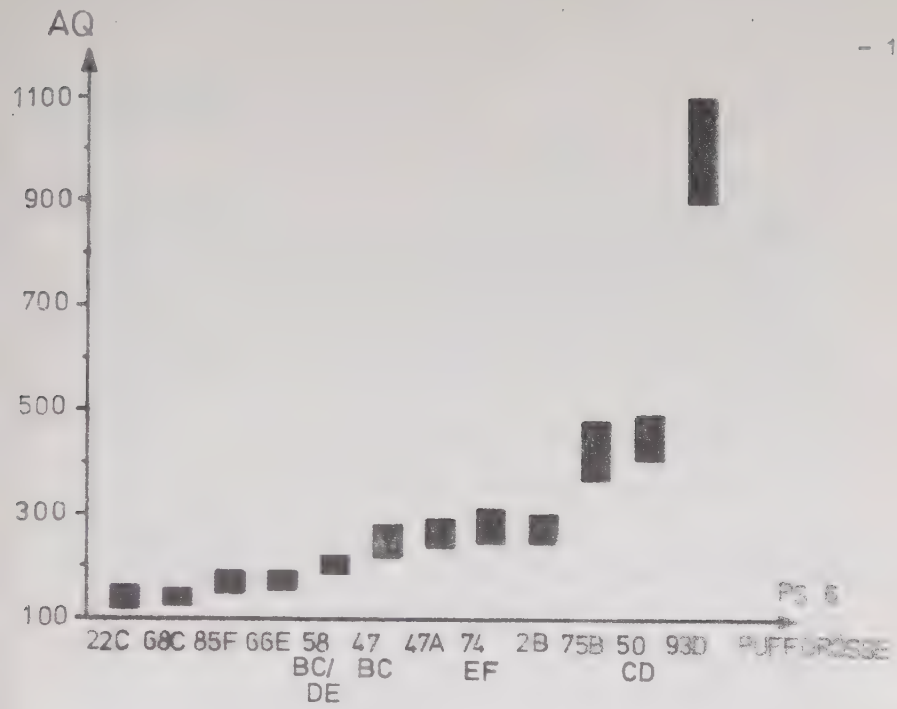
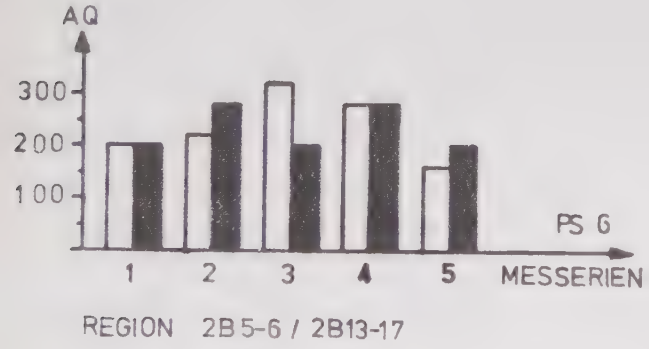


Abbildung 2



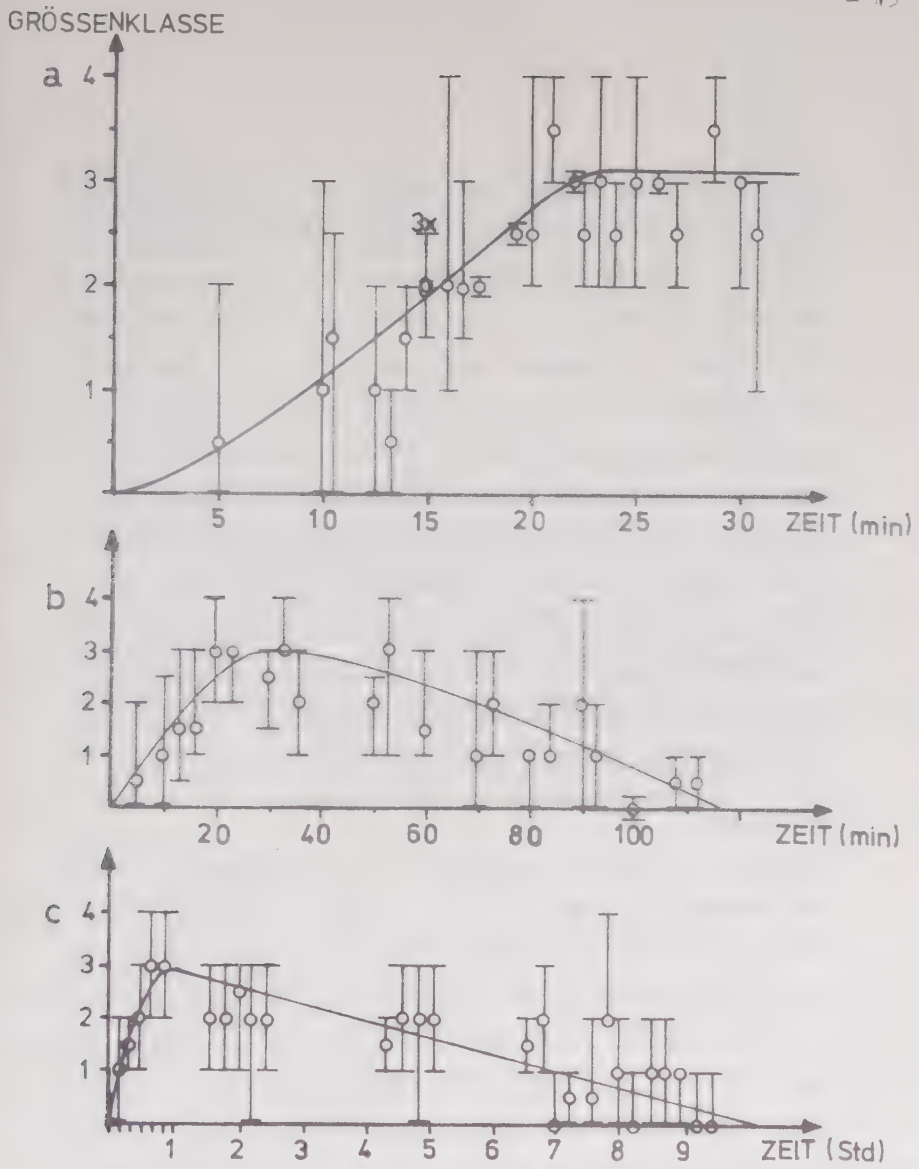
REGION 2B 5-6 / 2B13-17

se einheitlich. Am X-Chromosom war die Gendosiskompensation im Falle der XY-Konstellation nachweisbar (Abb. 2, Seite 13). Die RNA-Synthese in den Puffs 2B5-6 und 2B13-17 des X-Chromosoms stand der des XX-Chromosoms um nichts nach. Weiterhin wird bestätigt, daß die Grains in einer geraden Linie senkrecht zur Chromosomenachse (BERENDES, 1971) angeordnet vorliegen können (so in den Puffs 68C, 66E, 82F, 71DE, 50CD, 67B, 95D). Schließlich muß ein Puff nicht eindeutig gepufft sein, um einen erkennbaren Einbau zu zeigen (63BC, 67F, 66B, 66E, 82BC).

2. Hitzeschocks

Die isolierten Drüsen wurden kurzfristig (5min) auf 37°C erwärmt. Die Hitzepuffs entwickelten sich dann in der schon oft beschriebenen Art und Weise (RITOSSA, 1962,1963, ASHBURNER 1970c). Innerhalb von 20 min erreichen etwa 87A und 87B ihre maximale Größe (Abb. 3a, Seite 15) und verschwinden nach etwa 110 min (Abb.3b),wenn die Drüsen kurz nach der Präparation erhitzt werden. Dies gilt für PS1, PS6 und PS9. Inkubiert man sie aber erst 24 Std im Medium, dauert der Rückbildungsprozeß in der Regel 8-9 Std (Abb.3c). In den Diagrammen sind neben den"Mittelwerten" der Größenklassen die Variationsbreiten der ausgebildeten Puffs in einer Drüse angegeben. Da sich diese Puffs im Medium entwickeln, bleiben nach längerer Inkubationszeit Restaktivitäten dieser Puffs bestehen. Jedoch sind diese Puffs niemals so groß wie

Abbildung 3



Hitzeinduktion nach Präparation (Anstiegsphase Abb. 3a. Kurvenverlauf Abb. 3b) und nach 24-stündiger Inkubation (Abb. 3c): Erläuterungen im Text.

die durch Hitze induzierten Puffs. Die Reaktion auf Erwärmung ist in den Zellen einer Drüse unterschiedlich, wie aus Abb. 3 (Seite 15; Variationsbreite) zu entnehmen ist. So können Kerne 10 min nach der Hitzeinduktion keine Reaktion zeigen, in anderen haben die Puffs schon das höchste Entfaltungsniveau erreicht, während sich die Puffs des größten Teils der Kerne noch in der Vergrößerungsphase befinden. Die Reaktion muß also nicht besonders einheitlich verlaufen. Eine so drastische Größenreduktion der entwicklungsspezifischen Puffs wie sie ASHBURNER (1970b) beschreibt, habe ich hierbei nicht beobachten können. Wahrscheinlich schrumpfen diese Puffs schon kurz nach der Präparation. Die übrigen hitzeinduzierbaren Puffs 63BC, 64F, 67B, 70A und 93D erscheinen wie bei ASHBURNER (1970c) beschrieben.

3. Puromycin

Puromycin (100 µg/ml) induziert bei 2-3 stündiger Inkubation der Drüsen im Medium spezifische Puffs : 63BC, 64F, 67B, 87A, 87B, 70A (SCHOON und RENSING, 1973). Hierbei scheint bei unterschiedlichen Puffmusterphasen eine modifizierte Reaktivität der Drüsen vorzuliegen. So lassen sich die oben genannten Puffs bei PS 1 und PS 7-9 leicht induzieren, obwohl nicht immer Puffs auftreten müssen. Im PS 3-6 ist diese Reaktivität stark vermindert.

Std nach Eiablage	110	110-115	115-120
Drüsenanzahl	20	24	51
induziert	13	7	32
Größenklasse	3 - 4	1 - 2	2 - 4
Quotient Drüsen ind./ Drüsenanzahl	6.5	2.9	6.2

Autoradiographien bestätigten die Puffinduktion in folgenden Chromosomenregionen : 63BC, 64F, 67B, 70A, 73A, 87A, 87B und 23C, wobei 23C nicht immer ganz eindeutig induziert war. Zudem konnte eine Verstärkung der RNA-Synthese in allen untersuchten Puffs festgestellt werden : 47BC, 50CD, 58DE/BC, 66E, 74EF, 75B und 93D. Allerdings war der Nachweis der geringeren Empfindlichkeit im PS 6 auf Grund einer zu geringen Präperatezahl nicht möglich. Die nucleoläre RNA-Synthese schien nicht betroffen zu sein.

4. Cycloheximid

Das Cycloheximidmuster (100 µg/ml Medium ; PS6) unterscheidet sich deutlich vom Puromycinmuster (SCHOON und RENSING, 1973). So konnte in allen Präparaten eine Induktion von 63E nachgewiesen werden, ein Puff,der sich erst im PS 7 allmählich entwickelt und später eine maximale Größenentfaltung erreicht. Die hitzeinduzierbaren Puffs 87A, 87B und 63BC treten nicht auf. Die Autoradiogramme ergaben eine verstärkte RNA-Synthese in folgenden Loci : 47BC, 50CD, 58BC/DE, 66E, 74EF und 93D ; Zusätzliche Ak-

tivitäten traten in 63E, 67B, 73A und 23C auf. 63BC zeigte gegenüber den Kontrollen keine Veränderung und 75B wies sogar eine Reduktion seiner Markierung auf. Damit ist dann 74EF stärker markiert als 75B(\ Abb. 5, Seite 19). Die nucleoläre RNA-Synthese schien nicht betroffen.

5. α-Amanitin

Die Versuche, mit α-Amanitin die Induktion der Hitzepuffs bei unterschiedlicher Konzentration und Versuchsdauer zu verhindern, schlugen in den meisten Fällen fehl (Beispiele in Abb. 6a,b,c). Nur bei zwei Versuchen gelang in mehreren Präparaten die Unterdrückung dieser Puffs (Abb.6d), obwohl bei gleicher Konzentration und Inkubationsdauer (3 µg/ml; 7Std) andere Versuche ein negatives Ergebnis lieferten. Die nach Inkubation mit Amanitin (3 µg/ml; 7Std) hergestellten Autoradiogramme ergaben, daß die Entwicklung der hitzeinduzierbaren Puffs im Medium nicht verhindert wird. Zudem sind alle Puffs des vorhin beschriebenen PS 6 eindeutig markiert. Immerhin ist aber diese Markierung gegenüber den Kontrollen reduziert (50CD, 58BC/CD, 74EF, 75B; Abb. 4, Seite 19). Eigenartigerweise ist aber der Einbau in die Hitzepuffs 63BC, 67B und 93D nicht geringer, eher sogar etwas gesteigert. Gibt man nun nach 7-stündiger Inkubation einen Hitzeschock, so wird die RNA-Synthese allgemein verstärkt (Abb.4), wobei die normalen Puffs ihr altes Syntheseniveau wieder erreichen. Dagegen wird die Synthese in den

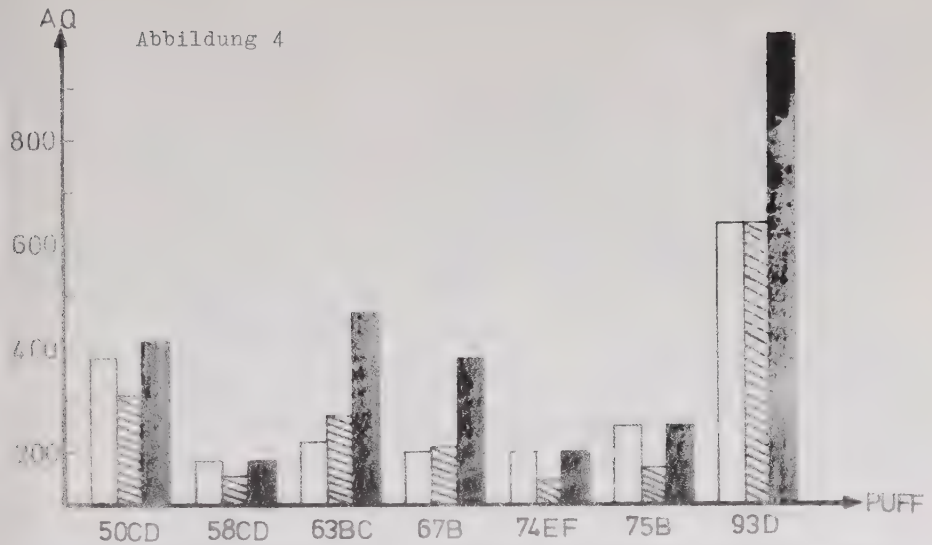


Abbildung 4

RNA-Synthese nach 7-stündiger Inkubation mit α-Amanitin. Weiße Balken : Kontrollen ; gestreifte Balken : 3 µg Amanitin/ml über 7 Std; schwarze Balken : Zusätzliche Hitzeschocks nach 6 1/2 Std.

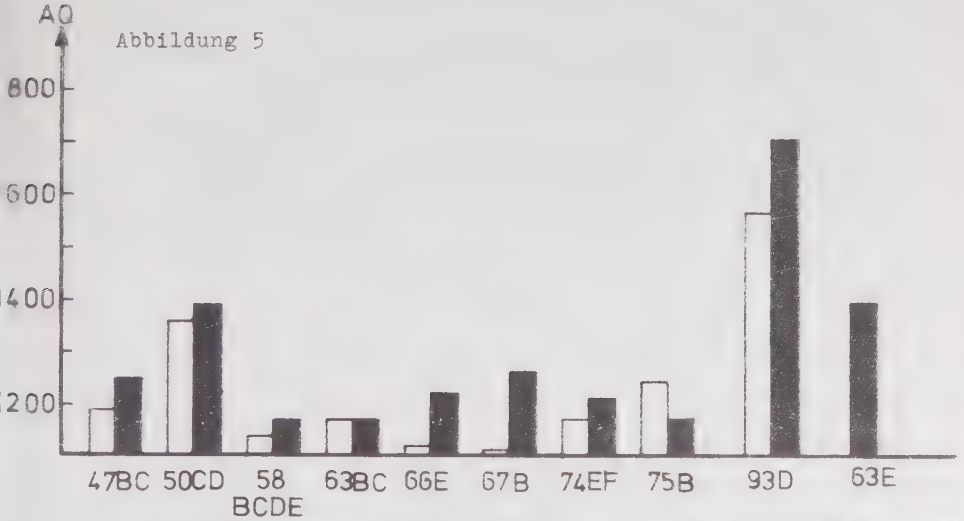
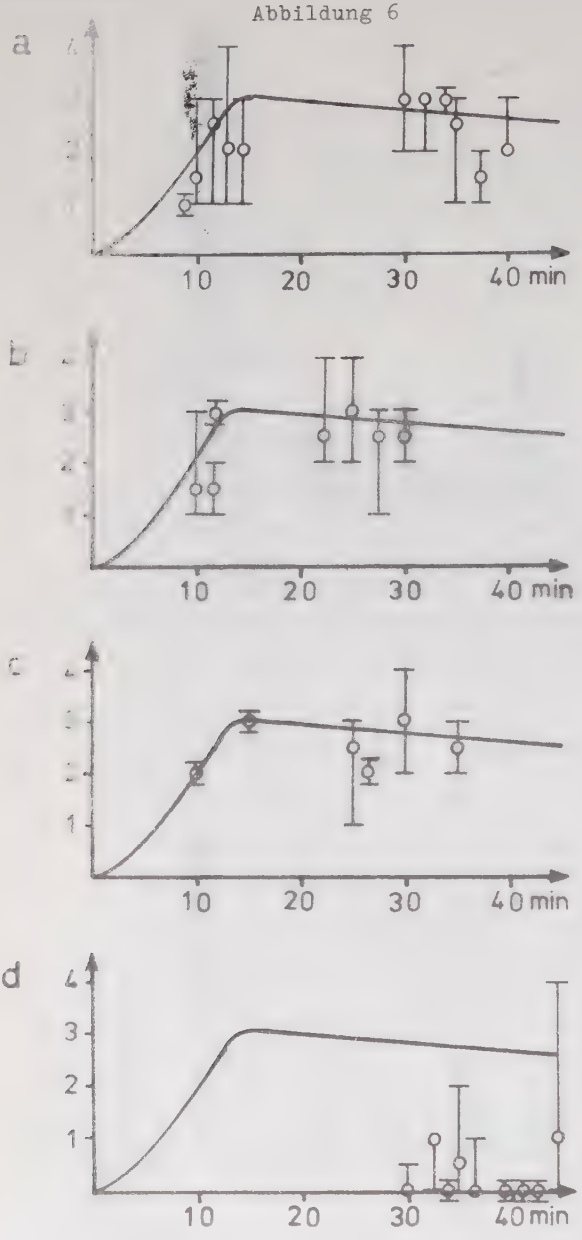


Abbildung 5

RNA-Synthese nach 2-stündiger Inkubation mit 100 µg Cyclohexamid. Weiße Balken : Kontrollen; schwarze Balken : Cyclohexamidinkubation.

GRÖSSENKLASSE

Abbildung 6



Hitzeinduktion der Puffs 87A/B bei 13 µg Amanitin/ml nach 2 Std.

Hitzeinduktion der Puffs 87A/B bei 3 µg Amanitin/ml nach 30 min.

Hitzeinduktion der Puffs 87A/B bei 1 µg Amanitin/ml nach 24 Std.

Hitzeinduktion der Puffs 87A/B bei 7 µg Amanitin/ml nach 7 Std.

Durchgezogene Linie : normale Induktionskurve. Erläuterungen im Text.

hitzeinduzierbaren Puffs erheblich gesteigert. Die Markierungsdichte über dem Nucleolus ist nicht verringert.

C. Diskussion

Die Inkubation von larvalen Drosophila Speicheldrüsen im angegebenen Medium ermöglicht mit gewissen Einschränkungen eine Simulation der in vivo Bedingungen. Allerdings bilden sich zusätzliche Puffs aus. So etwa die bei ASHBURNER (1972) als Medienpuffs bezeichneten Genaktivitäten in 85B, 84E und 57DE. Außerdem werden die hitzeinduzierbaren Puffs 93D, 87A, 87B, 63BC, 64F, 67B, 70C und 33B allmählich induziert. Diese Induktion tritt aber nicht in allen Fällen auf. Je besser der Drüsenzustand während der Inkubationszeit ist, desto weniger zahlreich ist die Induktion dieser Puffs. Diese und andere Umstände, die auch im Zusammenhang mit der Hitzeinduktion dargelegt werden sollen, könnten darauf hinweisen, daß die Drüsen energetisch unterversorgt sind. Aus diesem Grunde wird es notwendig sein, solche Substanzen, die direkt in den Citronensäurecyclus eingeschleußt werden (Malat, Succinat; das Angebot von Glutamat und Glutamin müßte ausreichen), dem Medium zuzusetzen (BERRIDGE, 1970). In die gleiche Richtung deuten die Befunde von LEENDERS und BERENDES (1972), die durch Zugabe von ATP, Succinat und Malat eine Induktion der Hitze- und Dinitrophenol-Puffs verhindern konnten. Auch die Verlängerung der Rückbildungsphase der hitzeinduzierten Puffs nach 24-stündiger Inkuba-

tion können auf energetische Schwierigkeiten hinweisen, da auch die Rückbildung der Puffs ATP verbraucht (LEENDERS und BECKERS, 1972).

Die Puffmusterentwicklung selbst wird mit wenigen Ausnahmen, die innerhalb einer Drüse beobachtet wurden, mit dem Moment der Präparation der larvalen Organe arretiert. Das mag auf das Fehlen eines übergeordneten Steuerorgans zurückführbar sein. So wird die Hormonzufuhr durch Entfernen der Hormondrüsen und des Gehirns unterbunden. Weitere Hinweise auf diesen Zusammenhang mögen das Ausbleiben der Histolyse und das manchmal unkoordinierte Auftreten der Medien- und Hitzepuffs sein. Auch die Differenz im Muster einer Drüse, die nach ASHBURNER (Zusf. 1972)in vivo stets synchron reagiert, mag darauf hinweisen. Die Reduktion der entwicklungsspezifischen Puffs ist ebenfalls auf das Fehlen des Ecdysons zurückführbar. Trotzdem bleiben diese Loci aktiv. So erhalten sich die spezifischen Muster der jeweiligen Entwicklungsphase während der Inkubation und sind eindeutig indentifizierbar. Das untersuchte Muster der 115 Std nach Eiablage ist mit dem PS6 von ASHBURNER (1967a) identisch. Es treten nur auf Grund der Inkubation im Medium gewisse Unregelmäßigkeiten auf. Allerdings scheint auch die Aktivitätsphase einiger Puffs, die hier untersucht werden konnten, länger zu sein als es ASHBURNER (1967a, 1972) beschrieben hat. So produzieren die Chromosomenregionen 82F, 85D, 68C, 66E, 66B im PS 6 RNA wie es die Autoradiogramme zeigen (Mikropuffs, BERENDES, 1972). Zudem scheint ein Puff in der Region 82D und

79EF vorzuliegen, die bisher noch nicht beschrieben wurden. Der Puffzustand dieser Regionen ist nicht immer eindeutig. Man könnte daraus schließen, daß sich Restaktivitäten in zurückgebildeten Puffs für längere Zeit erhalten und Puffs, die in einer späteren Phase besonders aktiv werden und puffen, schon lange vorher in ungepufften Zustand RNA synthetisieren. Dies würde auch mit der Theorie von WOLSTENHOLME (1965/1966) übereinstimmen, nach der wesentlich mehr Genloci aktiv sind als es die Puffmuster aufzeigen. Man darf also erwarten, daß sich durch spezifischere Markierung der Chromosomen weitere Genaktivitäten nachweisen lassen. Vielleicht lassen sich dann auch die Aktivitätsphasen der gelegentlich auftretenden Puffs, die auch hier häufig markiert waren, (ASHBURNER, 1967a) in das Entwicklungsmuster einordnen, wenn ihre Puffausbildungsphase nur hinreichend kurz ist.

Die Grains sind bei schwacher Markierung der Chromosomen fast ausschließlich über den Puffs lokalisiert. Erst bei steigender Markierungsdichte sind die übrigen Chromosomenregionen mehr oder minder mitmarkiert. Es wird sich wohl um abwandernde RNA handeln, die auf Grund ihrer DNA-ähnlichen Struktur leicht mit der DNA der übrigen Chromosomenregionen vorrübergehend assoziiert. Die Synthese der RNA in den Puffs ist wahrscheinlich abhängig von der Anzahl der aktiven DNA-Stränge, der Länge dieser Stränge, dem Ausmaß der RNA-Polymerase-Mobilisierung und des RNA-Abtransportes (PELLING, 1972). Ein Hinweis darauf ist die mit einem größeren Puff verbundene stärkere RNA-Synthese (ME-

CHELKE, 1959 ; BEERMANN, 1962 ; CLEVER, 1964 ; PANITZ und Mitarb.1972 u.a. ; siehe Abb. 1).Dabei deutet das Auftreten von Grains in einer Linie senkrecht zur Chromosomenachse an, daß nur eine spezifische Region der einzelnen DNA-Stränge eines Puffs synthetisch aktiv ist (BERENDES, 1971). Bei größeren Puffs muß daher die Grainlokalisierung noch genauer untersucht werden, da die Möglichkeit besteht, daß es sich um die Aktivitität mehrerer Chromosomenregionen handelt (etwa 50CD und 93D). Vielleicht spielt hier auch die Redundanz der DNA eine Rolle (KEYL, 1965a). Der Polymerasebesatz in den Puffs, die Anzahl der dereprimierten DNA-Stränge sind wohl die wichtigsten Ursachen ihrer RNA-Synthese und erklären ausreichend die Unterschiede der Markierung über den kleinen und größeren Puffs (PELLING, 1972). Die auffallende Markierungsdichte über 93D ist daher sicherlich das Produkt einer großen Anzahl aktiver DNA-Einheiten, von denen ein Teil im Verlauf der Induktion der " hitzeempfindlichen " Puffs aktiviert worden ist. Weitere Hinweise auf die Aktivierung zusätzlicher DNA-Abschnitte liefert das Phänomen der Gendosiskompensation (MUKHERJEE und BEERMANN, 1965 ; KORGE, 1970a und b ; HOLMQUIST, 1972) und auch die öfters auftretende hohe Markierungsdichte über kleinen Puffs dünner Chromosomen. Man darf daher annehmen, daß eine große Anzahl der DNA-Stränge eines Puffs normalerweise nicht aktiv ist (PELLING, 1972) und erst im Bedarfsfalle entblockiert werden. Das wird aber erst der Fall sein, wenn der Polymerasebesatz an den aktiven Genorten den Bedarf an RNA in der Zelle nicht mehr be-

friedigen kann. Zudem deutet der Befund an den Puffs 74EF und 75B auf eine weitere Regulationsmöglichkeit hin. Man kann bei diesen Puffs auf Grund der nahezu gleichen Entfaltung ihrer Puffregionen annehmen, daß etwa die gleiche Anzahl von DNA-Strängen aktiviert worden ist. Ist nun der Polymerase-Pool limitiert, kann der spezifische Einsatz von RNA-Polymerasen (vielleicht auf Grund einer gesteigerten Affinität der einen Region oder der Polymerase selbst) in bestimmten Puffs eine höhere RNA-Synthese zur Folge haben. Dies könnte auch für die Puffs 63BC und 63E bei Cycloheximidinduktion zutreffen.
Die Reaktion der Drüsenzellen auf den Hitzeschock entspricht den bisherigen Befunden insofern, als keine Alles- oder Nichts-Reaktion beobachtet wurde. Die induzierten Hitzepuffs fallen durch ihre schnelle Entwicklung und starke Größenzunahme auf (optimale Temperatur 37°C, nach 15 min halbmaximale Größe, maximale Größe nach 30-40 min, Regression nach 60-80 min bei Drosophila melanogaster, RITOSSA,1962, 1963 ; ELLGAARD, 1968,1972; ASHBURNER,1970c ; ELLGAARD und CLEVER, 1971 ; für Drosopila hydei BERENDES, 1968 ; für Chironomus,YAMAMOTO, 1970). Die Induktion anderer Puffs dauert etwas länger. So beschreibt ASHBURNER (1972), daß nach Ecdyson-Inkubation in vivo die erste Reaktion nach 15 min und die volle Größenentfaltung nach vier Std erreicht wird (ähnlich gilt für seine in vitro Versuche und für Drosophila hydei, BERENDES 1972). Bei SERFLING und Mitarb. (1969) dauerte die Induktion durch Oxytetracyclin 2 Std und die volle Größenentfaltung der Puffs wurde erst nach 20 Std

erreicht. Hier dürfte es sich jedoch um Sekundärwirkungen auf den Stoffwechsel handeln, die erst spät zum Tragen kommen. Die Hitzepuffs stimmen in ihrer Struktur mit anderen Puffs überein. So ergab die elektronenoptische Untersuchung von SORSA (1969) 3min nach der Induktion der Hitzepuffs eine Entfaltung des Chromatins und eine Akkumulation von fibrösem und granulärem Material; wahrscheinlich saure Proteine und RNP-Partikel. Dies weist darauf hin, daß die schnelle Reaktion und Größenentwicklung mit der spezifischen Induktionssituation in Beziehung stehen muß. Diese Puffs erscheinen unter exstremen Bedingungen, auf die die Zelle schnell und gezielt reagieren muß : crowded Kulturen (BERENDES, 1972), Hitze, Anaerobiosis, in lgl-Larven der Puff 63BC, in ltl-Larven die Puffs 93D, 95A, 87A und 87B (BREUGHEL und BOS, 1969), nach Behandlung mit Agentien, die spezifisch den Atmungsstoffwechsel beeinträchtigen (BERENDES, Zusf. 1972). Es scheint, daß die Induktion dieser Puffs spezifisch mit der Konzentration bestimmter Metabolite des Atmungsstoffwechsels gekoppelt ist (van BREUGHEL, 1966 ; LEENDERS und BERENDES, 1972 ; LEENDERS und BECKERS, 1972). Unter diesen Umständen ist es zum einen nicht verwunderlich, daß im Medium mit der Zeit Hitzepuffs induziert werden und zum anderen die Rückbildung der zusätzlich induzierten Hitzepuffs (nach 24-stündiger Inkubation) sehr lange dauert (LEENDERS und BECKERS, 1972) .

In diesem Zusammenhang ist es interessant, daß durch Puromycin die gleiche Klasse von Puffs induziert wird (SCHOON und REN-

SING, 1973). ASHBURNER (1970c) konnte dagegen in vitro mit Puromycin keine Puffs induzieren, obwohl in vivo nach Puromycininjektion induzierbare Puffs wie 23C, 73A, 74EF und 75B bei unseren Versuchen ein gleichartiges Verhalten zeigten (ASHBURNER, 1972). Die Tatsache, daß andere Puffs wie 93D (hitzeinduzierbar), 66E, 50CD, 58DE/BC ebenfalls induziert werden, spricht für eine allgemeine Steigerung der RNA-Synthese (HIGASHI und Mitarb. 1968 ; DÖRING und RENSING,1973), die wohl durch die Blockierung der Proteinsynthese und möglicherweise durch die Störung des Abtransportes (HENSHAW,1968) der RNA verursacht wird. Die spezifische Induktion der " hitzeinduzierbaren Puffs " durch Puromycin kann dann vielleicht auf die Wirkung von Polypeptidfragmenten (gestörte Repressor- und/oder Aktivatorwirkung) zurückgeführt werden, da Cycloheximid, das mit der Puromycin-Wirkung interferiert, die Induktion verhindert (SCHOON und RENSING, 1973).

ASHBURNER (1970c,1972) beschreibt für das Cycloheximid ähnliche Ergebnisse wie für das Puromycin. Es muß an dieser Stelle betont werden, daß auch solche Gemeinsamkeiten bei den hier dargestellten Versuchen bestehen. Dies betrifft die Induktion der Puffs 23C, 73A, 74EF, 66E, 47BC, 50CD, 58DE/BC, 93D, 67B. Trotzdem unterscheiden sich die Muster sehr spezifisch. So sinkt das Markierungsniveau von 75B unter das von 74EF. Dann fehlen die Puffs 87A und 87B,während ein neuer Puff, 63E, hinzukommt (SCHOON und RENSING, 1973). Allgemein kann man auch hier wie beim Puromycin eine gesteigerte RNA-Synthese annehmen. Auf eine

gestörte Repressorfunktion könnte speziell in diesem Fall die Induktion des Puffs 63E hinweisen, der kurz vor seiner normalen Induktion steht. Die wirklichen Ursachen der Induktionswirkung von Puromycin und Cycloheximid bleiben aber unklar.

α-Amanitin hemmt spezifisch die RNA-Polymerase II, während die Polymerase I relativ insensitiv ist (WIELAND, Zusf. 1972). Trotzdem ist der Erfolg der Amanitinhemmung recht unterschiedlich. Mit Sicherheit wird die Synthese der hochmolekularen RNA-Fraktionen gehemmt. Die Synthese der nucleolären RNA, der 4 - 5S RNA und möglicherweise der 15-45S RNA verläuft verhältnismäßig ungestört weiter (BEERMANN, 1971 ; EGYHAZI und Mitarb. 1972 ; HOLT und KNIPPERS, 1972 ; SERFLING und Mitarb. 1972). Nach BEERMANN (1971) bleibt die Markierung von 15% der Zellen einer Drüse spezifisch erhalten; ein Puff, I49A, scheint sogar amanitinresistent. Hier dürfte die mangelnde Resorption des Peptids und das Vorkommen insensitiver Polymerasen eine Rolle spielen (BEERMANN, 1971 ; EGYHAZI und Mitarb. 1972). Der Befund, daß die Synthese der hitzeinduzierbaren Puffs unbeeinträchtigt bleibt (HOLT und KNIPPERS, 1972), kann auch von uns bestätigt werden. Die im Medium auftretenden Hitzepuffs zeigen gleichbleibende RNA-Synthese unter Amanitineinfluß und steigern diese bei einem zusätzlichen Hitzeschock noch erheblich. Die Hemmung der RNA-Synthese ist mit Sicherheit eine Frage der Binnenkonzentration an Amanitin. Die geringe Hemmung der Synthese bei den hier vorliegenden Versuchen und die Schwierigkeiten bei der Unterdrückung der Hitzeinduktion sind daher

sicherlich auf zu geringe Amanitinkonzentrationen zurückzuführen. EGYHAZI und Mitarb. (1972) arbeiteten z.B. mit der fünffachen Menge an Amanitin. Die Steigerung der RNA-Synthese der übrigen Puffs kann u.U. durch die teilweise Ablösung der Proteinhülle der DNA nach Hitzeschock zustande gekommen sein.

D. Zusammenfassung

1. Ein neues Inkubationsmedium für larvale Drosophila-Speicheldrüsen wird beschrieben. Dieses Medium scheint die in vivo Bedingungen gut zu imitieren.
2. Nach Inkubation in diesem Medium wird die entwicklungsabhängige Änderung der Puffmuster arretiert. Die genetischen Aktivitäten aller Chromosomenloci bleiben trotz Größenreduktion der Puffs erhalten und gewährleisten die Identifizierung des Puffmusterstadiums.
3. Das PS6 (115 Std nach Eiablage) dieser Drüsen wurde mit autoradiographischen Methoden genauer untersucht. Es zeigten sich die spezifischen Aktivitäten des PS 6. Zudem trat nach länger dauernder Inkubation die Klasse der hitzeinduzierbaren Puffs (87A, 87B, 93D, 95D, 63BC, 64F, 67B, 70A und 33B)auf. Einige Puffs, die in der 115 ten Std nach der Eiablage als nicht aktiv angenommen wurden, sind markiert: 66B, 66E, 68C, 85D, 82F. Zwei neue Aktivitäten konnten in den Regionen 82CD und 79EF (Minipuffs) festgestellt werden.
4. In diesem Stadium läßt sich in den Regionen 2B5-6/2B13-17 des Heterosoms eine Gendosiskompensation nachweisen.
5. Die Drüsen reagieren auf Hitzeschocks durch spezifische Puffinduktion, deren Kinetik analysiert wird.
6. Puromycin und Cycloheximid induzieren bestimmte Aktivitätsmuster. Allgemein zeigt sich in den Loci 74EF, 66E, 47BC,

93B, 67B eine gesteigerte RNA-Synthese und eine zusätzliche Markierung über 23C und 73A. Der spezifische Unterschied besteht zwischen den beiden Antibiotica in der Induktion der Loci 87A, 87B und 63BC durch Puromycin und des Locus 63E durch Cycloheximid.

7. α-Amanitin hemmt bei einer Konzentration von 3 µg/ml nach 7Std die RNA-Synthese in den normalen Puffs, nicht aber die der hitzespezifischen Klasse, wobei diese durch zusätzlichen Hitzeschock eine noch stärkere RNA-Synthese aufweisen. Die nucleoläre RNA-Synthese ist nicht betroffen.

B. Literaturverzeichnis

ASHBURNER, M. (1967a): Patterns of puffing activity in the salivary gland chromosomes of Drosophila I. Autosomal puffing patterns in a laboratory stock of Dros. melanogaster. Chromosoma 21, 398-428

ASHBURNER, M. (1969a): Patterns of puffing activity in the salivary gland chromosomes of Drosophila II. X chromosome puffing patterns of Dros. melanogaster und Dros. simulans. Chromosoma 27, 47-63

ASHBURNER, M. (1970c): Patterns of puffing activity in the salivary gland chromosomes of Drosophila V. Responses to invironmental treatments. Chromosoma 31, 356-376

ASHBURNER, M. (1972): Puffing patterns in Drosophila melanogaster and related species. Aus : Developmental studies on giant chromosomes. Hrsg. W.Beermann, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1972, 101-151

BECKER, H.J. (1969) : Die Puffs der Speicheldrüsenchromosomen von Drosophila I. Chromosoma 10, 654-678

BEERMANN, W. (1956) : Nuclear differentation and functional morphology of the chromosomes. Cold Spring Harb.Symp.quant.Biol. 21, 217-232

BEERMANN, W. (1962) : Genaktivität und Genaktivierung von Riesenchromosomen. Verh.Dtsch.Zool.Ges. 25, 44-75

BEERMANN, W. (1971) : Effect of α-Amanitin on puffing and intranuclear RNA-synthesis in Chironomus salivary glands. Chromosoma 34, 152-167

BERENDES, H.D. (1968): Factors involved in the expression of gene activity. Chromosoma 24, 418-437

BERENDES, H.D. (1969): Induction and control of puffing. Ann Embryol. Morphogen. Suppl. 1, 153-164

BERENDES, H.D. (1971): Gene activation in Dipteran polytene chromosomes. Symp.Soc.Exp. Biol. XXV,145-161

BERENDES, H.D. (1972): The control of puffing in Drosophila hydei. Aus: Developmental studies on giant chromosomes. Hrsg. W.Beermann, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1972, 181-209

BERRIDGE, M.J. (1970): The role of 5-hydroxytryptamine and cyclic AMP in the control of fluid secretion by isolated salivary glands. J.Exp.Biol. 53, 171-186

van BREUGHEL, F.M.A. (1966): Puff induction in larval salivary gland chromosomes of Drosophila hydei Sturtevant. Genetica 37, 17-18

van BREUGHEL, F.M.A. und H.J. BOS (1969): Some notes on differential chromosome activity in Drosophila. Genetica 40, 359-378

BRIDGES C.B. und K.S. BREHME (1944): The mutants of Drosophila of Drosophila melanogaster. Carnegie Inst. of Washington. Publ. 552, p252

CLEVER, U. (1964):Genaktivitäten und ihre Kontrolle in der tierischen Entwicklung. Naturwissen. 51, 449

DEMEREC, M. (1950): Biology of Drosophila. New York, John Wiley& Sons, Inc. London Chapman&Hall Limited

DESAI, L. und R. TENCER (1968): Effects of histones and polylysine on the synthetic activity of the giant chromosomes of salivary glands of Dipteran larvae. Exp. Cell Res. 52, 185-197

DÖRING, R. und L. RENSING (1973): Circadian rhythm of different RNA fractions in rat liver and the effect of cycloheximid. Comp.Biochem.Physiol. 45B, 285-290

EGYHAZI, E. ,B. D'MONTE, J.E.EDSTRÖM (1972): Effects of α-amani-

tin on in vitro labeling of RNA from defined nuclear components in salivary gland cell of Chironomus tentans. J.Cell Biol. 33, 523-531

ELLGAARD E.G. (1968): An analysis of puff formation und regression in polytene chromosomes of Drosophila melanogaster. Ph.D.Thesis, University of Texas

ELLGAARD E.G. (1972): Similarities in chromosomal puffing induced by temperature shock and DNP in Drosophila. Chromosoma 37,412-422

ELLGAARD E.G. und U. CLEVER (1971): RNA metabolism during puff induction in Drosophila melanogaster. Chromosoma 36, 60-78

HENSHAW, E.C. (1968): Messenger RNA in rat liver polyribosomes: evidence that its exists as RNP-particles. J. Mol. Biol. 36, 401-411

HIGASHI,K. , T. MATSUHISA, A. KITAO und Y. SAKAMOTO (1968): Selective suppression of nucleolar RNA metabolism in the absence of protein synthesis. Biochim.Biophys. Acta 166, 388-393

HOLMQUIST, G. (1972): Transcription rates of individual polytene chromosome bands: Effects of gene dose and sex in Drosophila. Chromosoma 36, 413-452

HOLT, Th.H. und A.M.C. KNIPPERS (1972): Induction of chromosome puffs in Drosophila hydei salivary glands after inhibition of RNA-synthesis by α-amanitin. Chromosoma 37, 423- 432

KEYL, H.E. (1965a): Duplikationen von Untereinheiten der chromosomalen DNA während der Evolution von Chironomus thummi. Chromosoma 17, 139-180

KORGE, G. (1970a): Dosage compensation and effect for RNA-synthesis in chromosome puffs of Drosophila melanogaster. Nature 225, 386-388

KORGE, G. (1970b): Dosiskompensation und Dosiseffekt für die RNS-Synthese in Chromosomenpuffs von Drosophila melanogaster. Chromosoma 30, 430-464

LEENDERS, H.J. und H.D.BERENDES (1972): The effect of changes in the respiratory metabolism upon genome activity in Drosophila I. Chromosoma 37, 433-444

LEENDERS, H.J. und P.J.A. BECKERS (1972): The effect of changes in the respiratory metabolism upon genome activity II. J.Cell Biol. 55, 257-265

MECHELKE, F. (1959): Beziehungen zwischen der Menge der DNS und dem Ausmaß der Oberflächenentfaltung der Riesenchromosomenloci. Naturwissen. 21, 609

MUKHERJEE, A.S. und W.BEERMANN (1965): Synthesis of ribonucleic acid by the X-chromosomes of Drosophila melanogaster and the problem of dosage compensation. Nature (Lond.) 207, 785-786

NAGEL, G. und L.RENSING (1971): Puffing pattern and puff size of Drosophila salivary gland chromosomes in vitro. Cytobiologie 3, 288- 292

NICOLETTI, B. (1959): An efficient method for salivary gland chromosome preparation. Dros.Inf.Serv. 33, 181

PANITZ R. , E. SERFLING und U.WOBUS (1972): Autoradiographische Untersuchungen zur RNA-Syntheseleistung von Balbiani-Ringen. Biol.Zbl.91, 359-380

PELLING, C. (1964): Ribonucleinsäure-Synthese der Riesenchromosomen . Autoradiographische Untersuchungen an Chironomus tentans. Chromosoma 15,71-122

PELLING, C. (1972): Transcription in giant chromosomal puffs. Aus: Developmental studies on giant chromosomes. Hrsg. W.Beermann, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1972,87-98

PROBECK, H.D. und L.RENSING (1973):in Vorbereitung

RENSING, L. (1966a): Zur circadianen Rhythmik des Sauerstoffverbrauchs von Drosophila. Z. vergl. Physiol. 53, 62-83

RENSING, L. (1966b): Zur circadianen Rhythmik des Hormonsystems von Drosophila. Z. Zellforsch. 74, 339-588

RENSING, L. (1969): Circadiane Rhythmik von Drosophila Speicheldrüsen in vivo, in vitro und nach Ecdysonzugabe. J. Insect Physiol. 15, 2285-2303

RITOSSA, F. (1962): A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in Drosophila. Experientia, 18, 571-573

RITOSSA, F. (1963): New puffs induced by temperature shock, DNP and salicylate in salivary chromosomes of Drosophila melanogaster. Dros. Inf. Serv. 37, 122-123

SCHOON, H. und L.RENSING (1973): The effects of protein synthesis-inhibiting antibiotics on the puffing pattern of Drosophila salivary gland chromosomes in vitro. Cell Differentation 2, 97-106

SERFLING E. , R.PANITZ und U.Wobus(1969): Die experimentelle Beeinflussung des Puffmusters von Riesenchromosomen I. Puffinduktion durch Oxytetracyclin bei Chironomus thummi. Chromosoma 28, 107-119

SERFLING, E. , U.WOBUS und R.PANITZ (1972): Effect of α-amanitin on chromosomal and nucleolar RNA-synthesis in Chironomus thummi polytene chromosomes. FEBS letters 20, 148-152

SORSA, M. (1969b): Ultrastructures of puffs in the proximal part of chromosome 3R in Drosophila melanogaster. Ann.Acad.Sci.Fenn. Serie A,IV Biologica 150

WEBER, E. (1956) : Grundriss der biologischen Statistik. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 420

WIELAND, Th. (1972): Struktur und Wirkung der Amatoxine. Naturwissen. 59, 225-231

WOLSTENHOLME, D.R.(1965): The distribution of DNA and RNA in salivary gland chromosomes of Chironomus tentans as revealed by fluorescence microscopy. Chromosoma 17, 219-229

WOLSTENHOLME, D.R.(1966): Evidence for the presence of DNA in interbands of Drosophila salivary gland chromo-

somes. Genetics 53, 357-360

YAMAMOTO, H. (1970): Heatshocks induced puffing changes in balbiani rings. Chromosoma 32 , 171-190

TEIL II

TAGESRHYTHMISCHE RNA-SYNTHESE IN DEN PUFFS LARVALER DROSOPHILA MELANOGASTER SPEICHELDRÜSEN IN VITRO

Einleitung

Zahlreiche biologische Prozesse auf verschiedenen Organisationsebenen von Organismen zeigen tagesperiodische Änderungen gleicher oder unterschiedlicher Phasenlage und Amplitude. So verlaufen bei Drosophila die Eiablage und Puppariumsbildung (RENSING und HARDELAND, 1967), das Schlüpfen der Imagines (PITTENDRIGH, 1966), deren Lokomotions- und Balzaktivität sowie der Sauerstoffverbrauch (RENSING, 1966a ; RENSING und Mitarb. 1968 ; HARDELAND und STANGE, 1971) tagesrhythmisch. Auch Zellen bestimmter Gewebe von Drosophila weisen in vivo und in vitro tagesrhythmische Änderungen auf, so etwa das Nucleus- und Nucleolusvolumen der Speicheldrüsen (RENSING, 1969). Die Tatsache, daß bei Einzellern (EHRET und WILLE, Zusf. 1970 ; VAN-DEN DRIESSCHE, 1971) und in Zellkulturen (ANDREWS und FOLK, 1964 ; RENSING, 1969 ; HARDELAND, 1972) derartige Oscillationen auftreten, rechtfertigen die Annahme, daß die Ursache dieser Schwingungen auf zellulärer Ebene zu suchen ist.
Eine essentielle Voraussetzung der Rhythmik auf zellulärem Niveau scheint die RNA-Synthese zu sein (SCHWEIGER und Mitarb. 1964 ; KARAKASHIAN und HASTINGS, 1963). In diesem Zusammenhang ist auf der einen Seite das Chronon-Konzept (EHRET und TRUCCO, 1967) zu nennen : Dabei sollen die tagesrhythmische Transcription und die damit gekoppelten Transport- und Translationsschritte den 24- stündigen Rhythmus erzeugen. Allerdings kann diese Hypothese nicht alle Phänomene erklären, sodaß auf der anderen Seite Modelle, bei denen die Elemente des schwingenden

[illegible]tosas Enzym- oder Membranprozesse sind, an Gewicht gewinnen.

Die bisherigen Befunde zeigen eine tagesrhythmische Brutto-RNA-Synthese (DÖRING und RENSING, 1973 ; PROBECK und RENSING [illegible]), bei der allerdings eine hormonelle Kontrolle nicht auszuschließen ist. Daher schien es interessant, die RNA-Synthese einzelner Genorte zu untersuchen. Als Objekt hierfür bot sich die RNA-Synthese in Puffs der Riesenchromosomen von Dipteren an. Da diese Versuche in vitro durchgeführt wurden, ist die Einwirkung nervöser und hormoneller Steuerungsmechanismen ausgeschlossen. Es kann daher der Frage nachgegangen werden, ob die Synthese in diesen Loci einem allgemeinen rhythmischen Kontrollmechanismus unterliegt oder ob Gensequenzen zu verschiedenen Tageszeiten aktiv werden.

A. Material und Methoden

1. Stamm und Präparation

Teil I, Seite 3

2. Medium

Teil I, Seite 4

3. Kerndurchmesser

Die Drüsen wurden 24 Std im Medium inkubiert. Dann begannen die Messungen (siehe auch RENSING, 1969). Das Produkt aus langem und kurzem Durchmesser der elliptischen Kernquerschnitte diente als Indikator für das Volumen.

4. Puffbestimmung

Die Puffloci wurden nach Arbeiten von BRIDGES und BREHME (1944) und ASHBURNER (Zusf.1972) bestimmt.

5. Puffquotient (PQ)

Zur Bestimmung des Puffquotienten wurde (benutzt wurde ein Mikroskop mit Zeichenaufsatz) der Durchmesser der Puffs und der Durchmesser einer in der Nähe liegenden Bezugsbande gemessen. Zum Ausgleich unterschiedlicher Polytänie- und Quetschungsgrade wurde der Quotient beider Werte bestimmt : $PQ = \frac{\text{Puffdurchmesser}}{\text{Bezugsbande}}$. Zur Bestimmung des Mittelwertes je Tageszeit wurden etwa 5-8 Versuche gemacht. Von jeder Drüse wurde jeder zu untersuchende Puff in 5 verschiedenen Chromosomensätzen gemessen, dieser Wert gemittelt und der entsprechenden Meßserie zugeordnet. Der Mittelwert jeder Meßserie (etwa 20 Werte) und die Abweichungen von die-

sem (dreifacher mittlerer Standardfehler) wurden berechnet.

6. Autoradiographie

Teil I, s. Seite 6 und 7

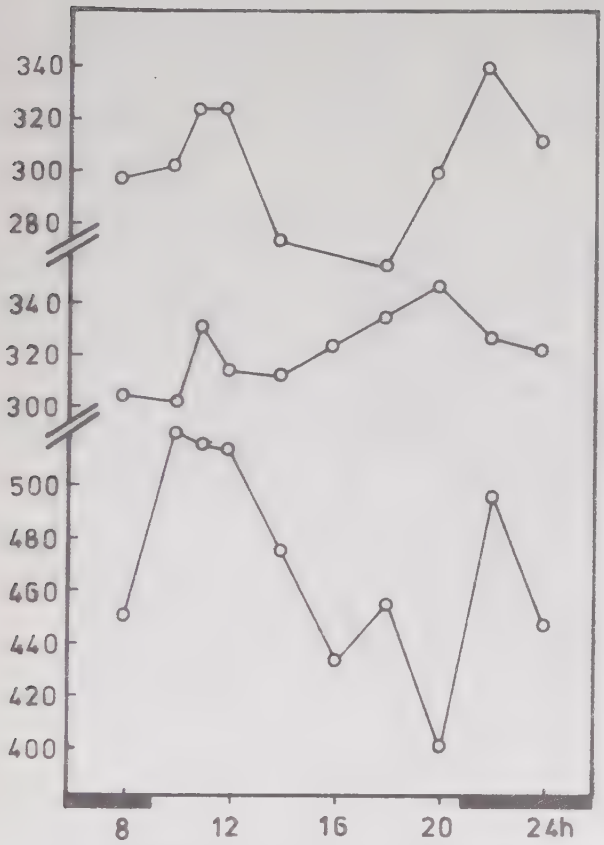
Hier wurde sofort nach der Präparation und dann zu den entsprechenden Tageszeiten inkubiert. Auch bei diesen Untersuchungen wurden je Tageszeit 5-8 Versuche durchgeführt, wobei an jedem Präperat für jeden Puff fünf Auszählungen vorgenommen wurden. Diese Werte wurden nach dem auf Seite 7, Teil I beschriebenen Verfahren korrigiert und dann der Meßserie zugeordnet. Dann wurde der Median jeder Meßserie und das entsprechende Konfidenzintervall bestimmt ($c_{95\%} = x\sqrt{\frac{N}{4}}$). Für 11^{00} und 17^{00} Uhr lagen 20-30, für 21^{00}, 24^{00} und 8^{00}Uhr je 40 Werte vor.

B. Ergebnisse

1. Kerngröße

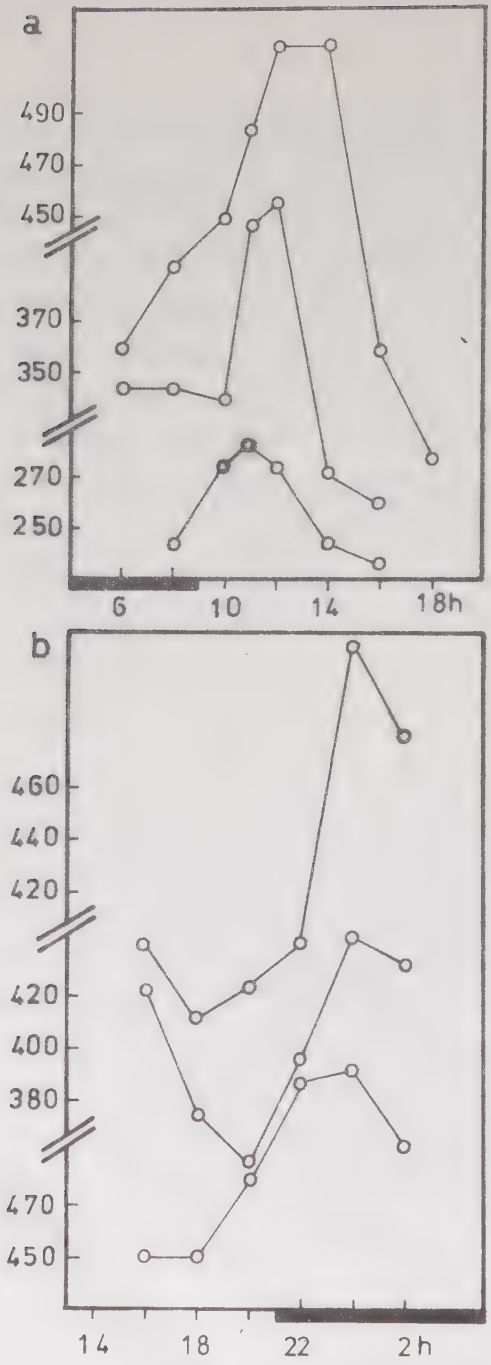
Da das Medium im Vergleich zu früheren Arbeiten doch einschneidend verändert worden ist, lag es nahe, noch einmal die Kerngrößenrhythmik zu untersuchen. Auch in den neueren Versuchsreihen ergeben sich zwei deutliche Maxima in der Zeit zwischen $10\text{-}14^{00}$ und $22\text{-}24^{00}$Uhr. Die Minima liegen zwischen $15\text{-}18^{00}$ und $4\text{-}6^{00}$ Uhr (RENSING, 1969). Die Veränderungen der Kerngröße in den Zellen einer Drüse sind nicht exact synchronisiert:So ergeben sich die in Abb. 1 dargestellten Schwankungsbreiten der Minima und Maxima. Die ständige Belichtung und Erwärmung der Drüsen beim Messen der Ker-

Abb.1



Kernvolumen verschiedener Speicheldrüsenkerne. Ordinaten : Produkte aus kleinem und großem Durchmesser der Kerne, Abszisse : Tageszeit.

Abb. 2



Kernvolumina bei kurzfristigen Messungen zwischen a. 6-18^{00} und b. 15-2^{00}Uhr. Ordinate : Produkte aus kleinem und großem Durchmesser; Abszisse : Tageszeit .

ne wirkt sich anscheinend negativ auf die Rhythmik aus. Die Amplitude der Schwingungen wird zum Teil wesentlich verringert. Mißt man daher über kürzere Zeiträume, sind die Schwankungen der Kerngröße deutlicher (Abb. 2a und b, Seite 5).

2. Puffgröße

Die Drüsen wurden isoliert, 24Std und je nach Tageszeit länger im Medium inkubiert, dann fixiert, gefärbt und gequetscht. Folgende Puffs wurden gemessen : 23E, 22C (2L); 47A/BC, 50CD, 58BC/DE (2R); 62E, 63BC, 66E, 67B, 68C, 75D, 74EF, 78D (3L); 82F, 83E, 85F, 93D (3R). Die Ergebnisse sind in den Abb. 3-10 (Seite 11-18) dargestellt. Die Änderung der Puffgröße war nur in wenigen Fällen signifikant : 23E, Abb. 3 ; 50CD,Abb.4 ; 74EF,75B,Abb.7 ; 93D,Abb.8 und fast auch 66E,Abb.6 . Es handelt sich fast ausnahmslos um grössere Puffs, die eine starke RNA-Synthese aufweisen (siehe Teil I, Abb. 1). Die übrigen Puffs zeigen zumindestens die gleiche Tendenz der Puffvergrößerung bzw. Verkleinerung : 47A/BC, 58BC/DE, 22C, 62E, 67B, 68C, 78D, 85F ; 82F und 83E, die nicht dargestellt wurden. Die Maxima der Puffgröße liegen gegen 8^{00}Uhr (kurz vor Licht an) und 21^{00}Uhr (Licht aus), die Minima in den Zwischenzeiten ($10\text{-}17^{00}$ und 24^{00}-4^{00}Uhr). Die Werte von 8^{00}Uhr setzen sich aus Messungen nach 24 und 48 Std zusammen, wobei die Werte nach 48Std teilweise etwas höher lagen. Die Maxima sind um 2-4 Std phasenverschoben gegenüber den später auftretenden Kerngrößenmaxi-

ma. Dies gilt für fast alle Puffs. Nur bei 23 E (und auch bei 82F und 83E) ist in der Dunkelheit kein Abfall der Puffgröße feststellbar. Ausnahmen stellen die Puffs der hitzeinduzierbaren Klasse dar, die in diesem Medium induziert werden : 93D, 67B (Abb.8 und 10) und mit Einschränkung 63BC (Abb.10). So weist 93D nur ein Maximum gegen 4^{oo}Uhr und ein Minimum gegen 24^{oo}Uhr auf. 67B und 63BC haben zwar die üblichen Maxima, jedoch auch ein Zusatzmaximum gegen 4^{oo}Uhr. Die Ursache dieses Maximums bleibt unklar, kann jedoch mit der Induzierbarkeit dieser Puffs zusammenhängen.

Bei der Auswertung und Darstellung des Tagesganges der Puffgröße wurden nur solche PQ-Werte in einer Meßserie benutzt, die das Mittel aus verschiedenen Messungen des betreffenden Puffs in einer Drüse darstellten. Die nicht benutzten Einzelwerte (wenn der Puff nur einmal meßbar gewesen war) wurden auch zusammengestellt und das Mittel je Tageszeit bestimmt. Es ergab sich eine hinreichende Übereinstimmung. Deshalb sollen hier noch die Werte einer Tageszeit einander gegenübergestellt werden:

Werte für 10-11Uhr

Puff	Gruppenwert (PQ) (Mittel)	Einzelwert(PQ) (Mittel)
63BC	143	147
66E	145	150
67B	138	140
68C	186	193
74EF	169	160
75B	179	162

Puff	Gruppenwert	Einzelwert
78D	140	151
23E	138	136
22C	137	136
58BC/CD	160	160
50CD	188	186
47BC	147	146
82F	125	122
85F	172	162
93D	175	165
83E	119	129

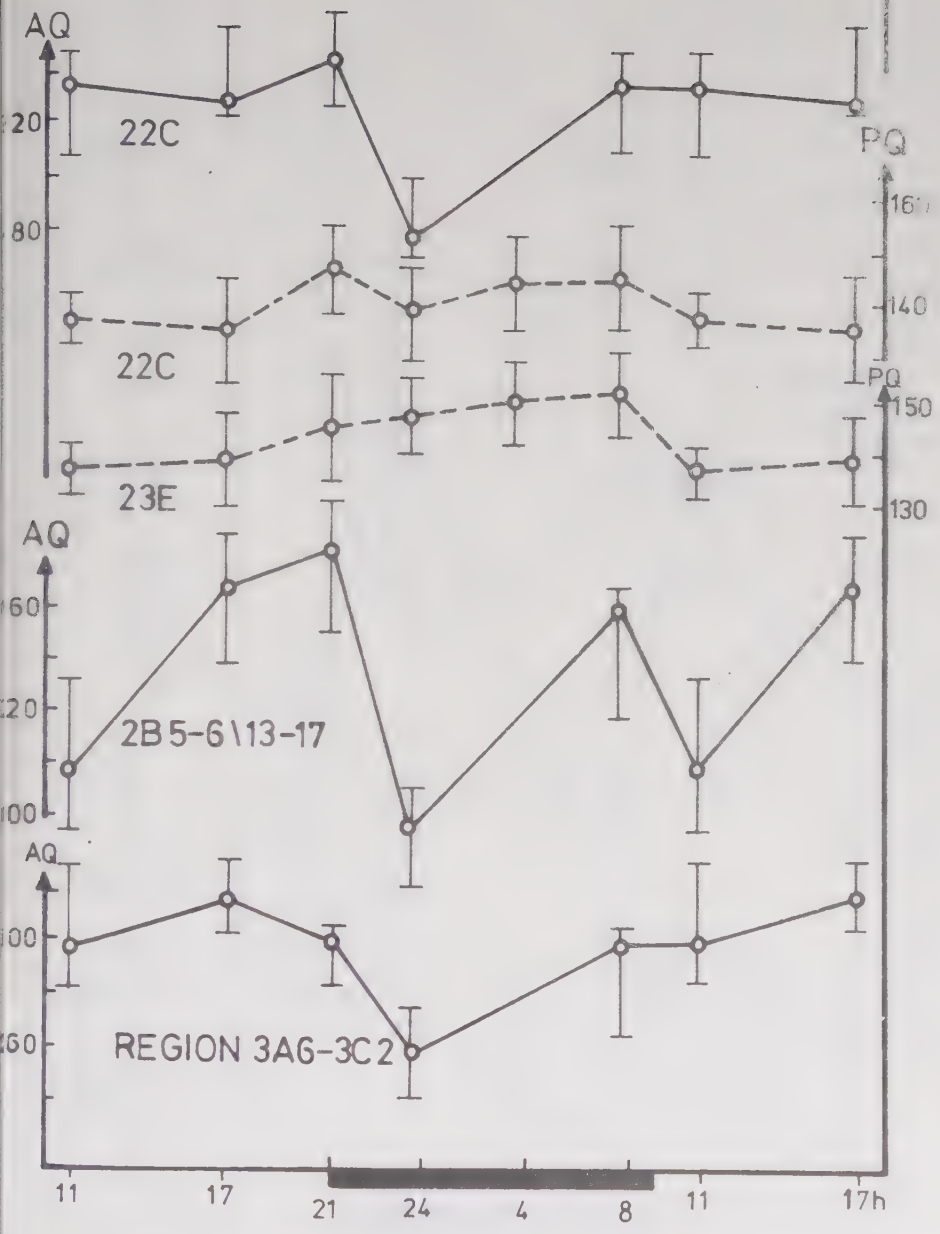
3. RNA-Markierung

Folgende Regionen und Puffs wurden ausgezählt: 3A6-3C2 (Rhythmusregion, KONOPKA und BENZER, 1971), 58A-60F (Chromosomenbackground); 2B5-6/13-17 (X); 58BC/DE, 50 CD, 47A, 47BC (2R); 63BC, 66B, 67B, 74EF, 75B (3L); 93D, 85 F (3R); Nucleolus. Die Ergebnisse sind an den Abbildungen 3 - 11 dargestellt (ausgezogene Linien,Seite 10-19). Die Schwankungen der RNA-Synthese sind jetzt wesentlich deutlicher und daher in allen Puffs signifikant. Die Befunde bestätigen die Ergebnisse der Puffgrößenmessungen, da die Maxima in den meisten Fällen gegen 8^{00}Uhr (kurz vor Licht an) und 21^{00}Uhr (Licht aus) liegen. Das Minimum gegen 24^{00} Uhr ist besonders deutlich ausgeprägt, während das Minimum zwischen $11-17^{00}$durch die sich schon gegen 17^{00}Uhr steigernde RNA-Synthese verwischt wird, die ihren Gipfelpunkt gegen 21^{00}Uhr erreicht. Hieran wird deutlich, daß die RNA-Synthese-

Zu den Abb. 3-11

Dargestellt werden die Puffgrößenänderungen (PQ), meistens auf der rechten Ordinate abgetragen, Kurvenverlauf gestrichelt und das Ausmaß der Markierung über den einzelnen Genorten (AQ), auf der linken Ordinate abgetragen, Kurvenverlauf ausgezogen im Tagesverlauf (Abszisse : Tageszeit). Der dunkle Balken auf der Abszisse gibt die Dunkelzeit an.
Die Abweichungen der Puffgröße stellen den dreifachen mittl. Standardfehler dar, die der Markierung das 95% Konfidenzintervall (siehe Material und Methoden).

Abb. 3


AQ
220
180
22C
PQ
160
140
22C
PQ
150
130
23E
AQ
160
120
100
2B 5-6\13-17
AQ
100
160
REGION 3A6-3C2
11
17
21
24
4
8
11
17h

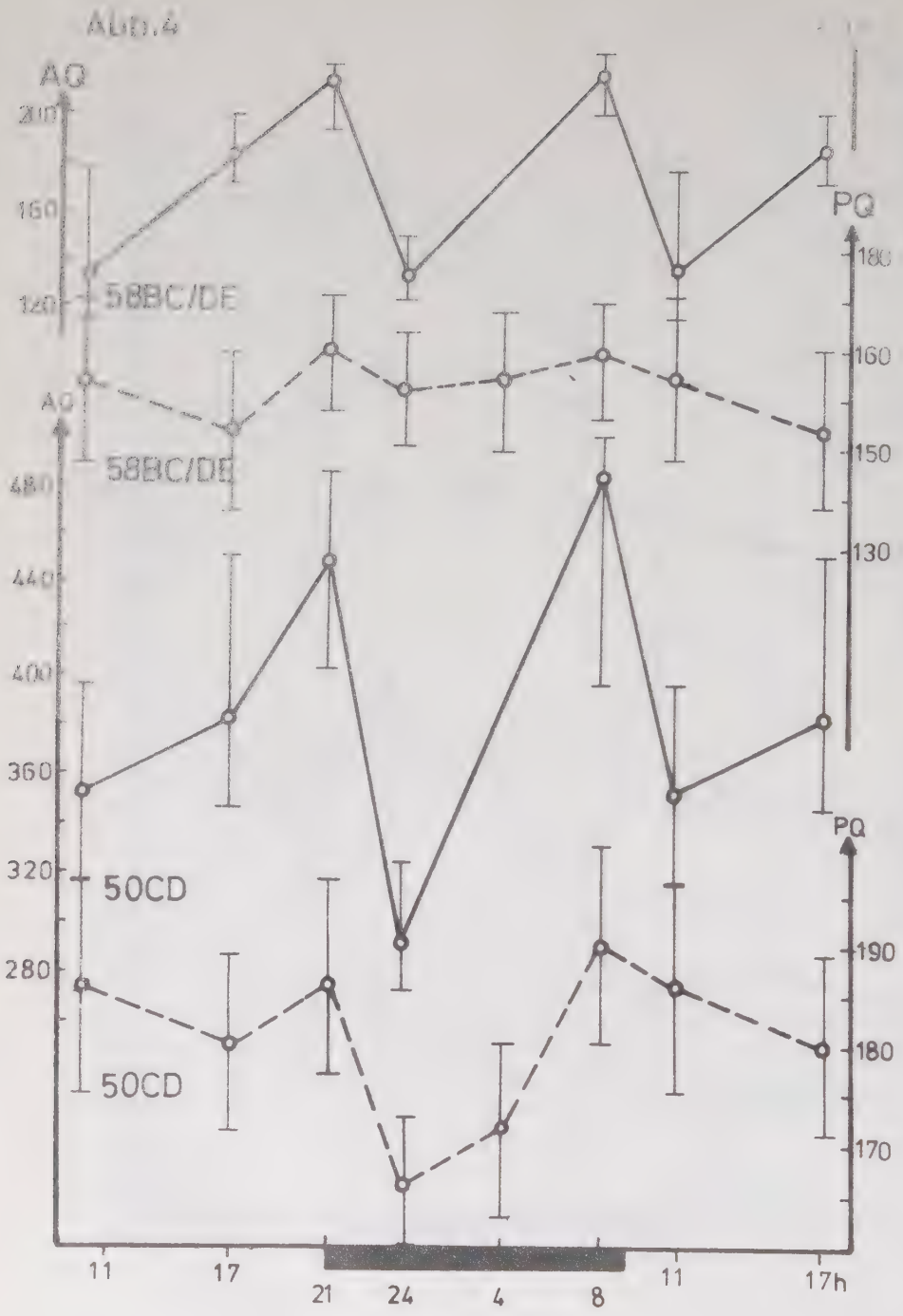


Abb.4
AQ
200
160
120
58BC/DE
AQ
58BC/DE
480
440
400
360
320
280
50CD
50CD
PQ
180
160
150
130
PQ
190
180
170
11
17
21
24
4
8
11
17h

Abb.5

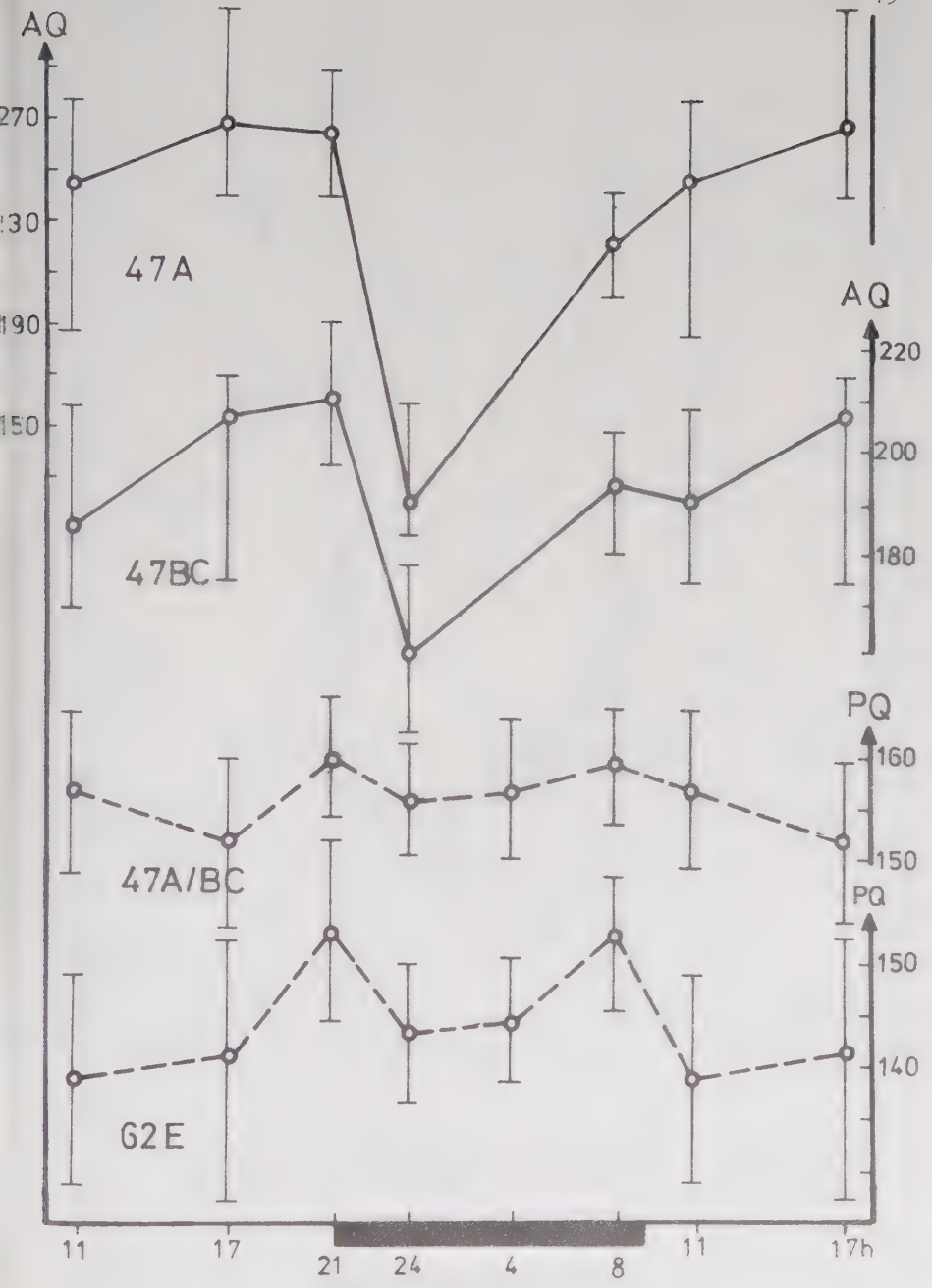

AQ
270
230
190
150
47A
47BC
AQ
220
200
180
PQ
160
150
47A/BC
PQ
150
140
G2E
11
17
21
24
4
8
11
17h

Abb.6

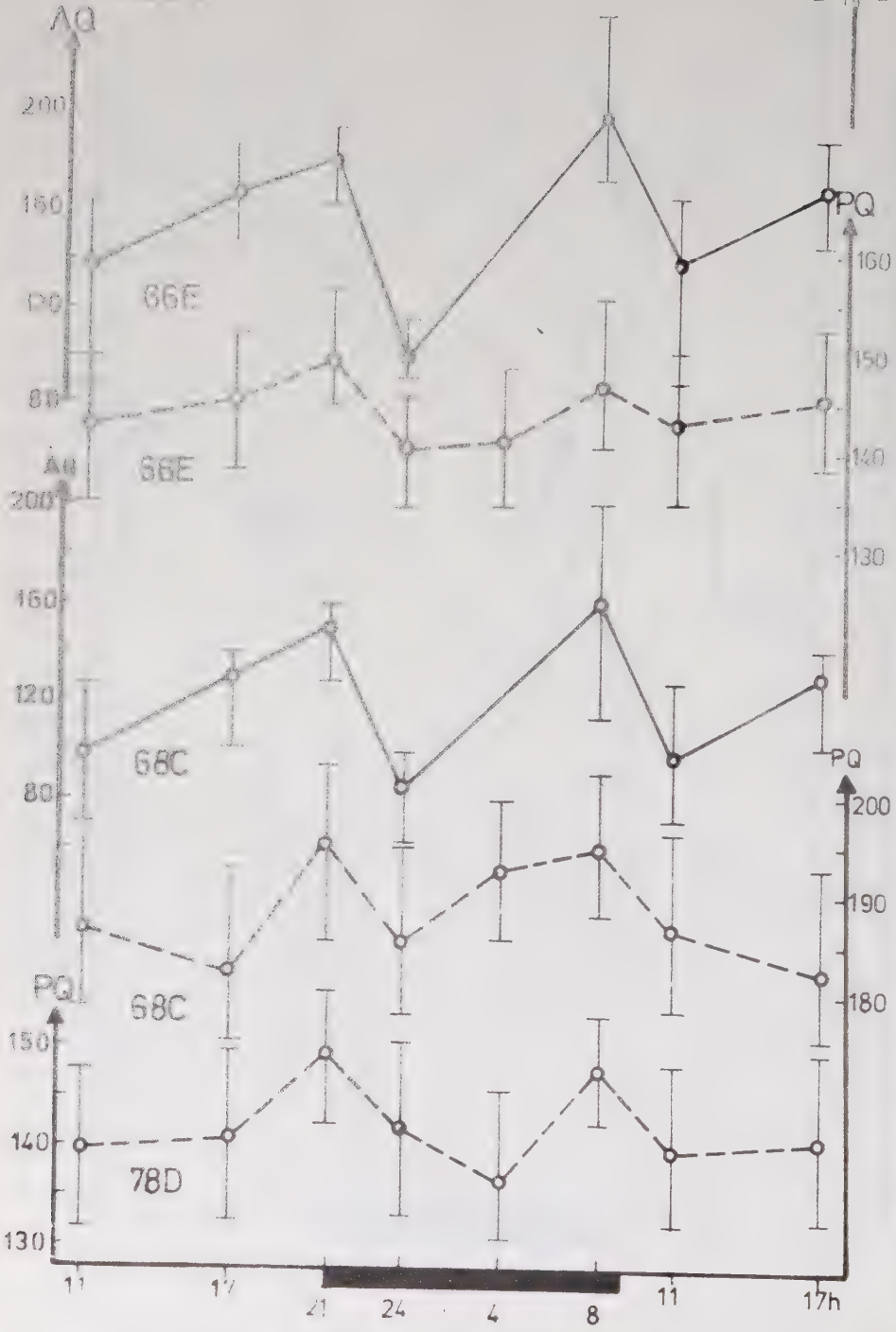

AQ
200
160
120
80
66E
66E
AQ
200
160
120
80
68C
PQ
150
140
130
78D
PQ
160
150
140
130
PQ
200
190
180
11
17
21
24
4
8
11
17h

Abb. 7

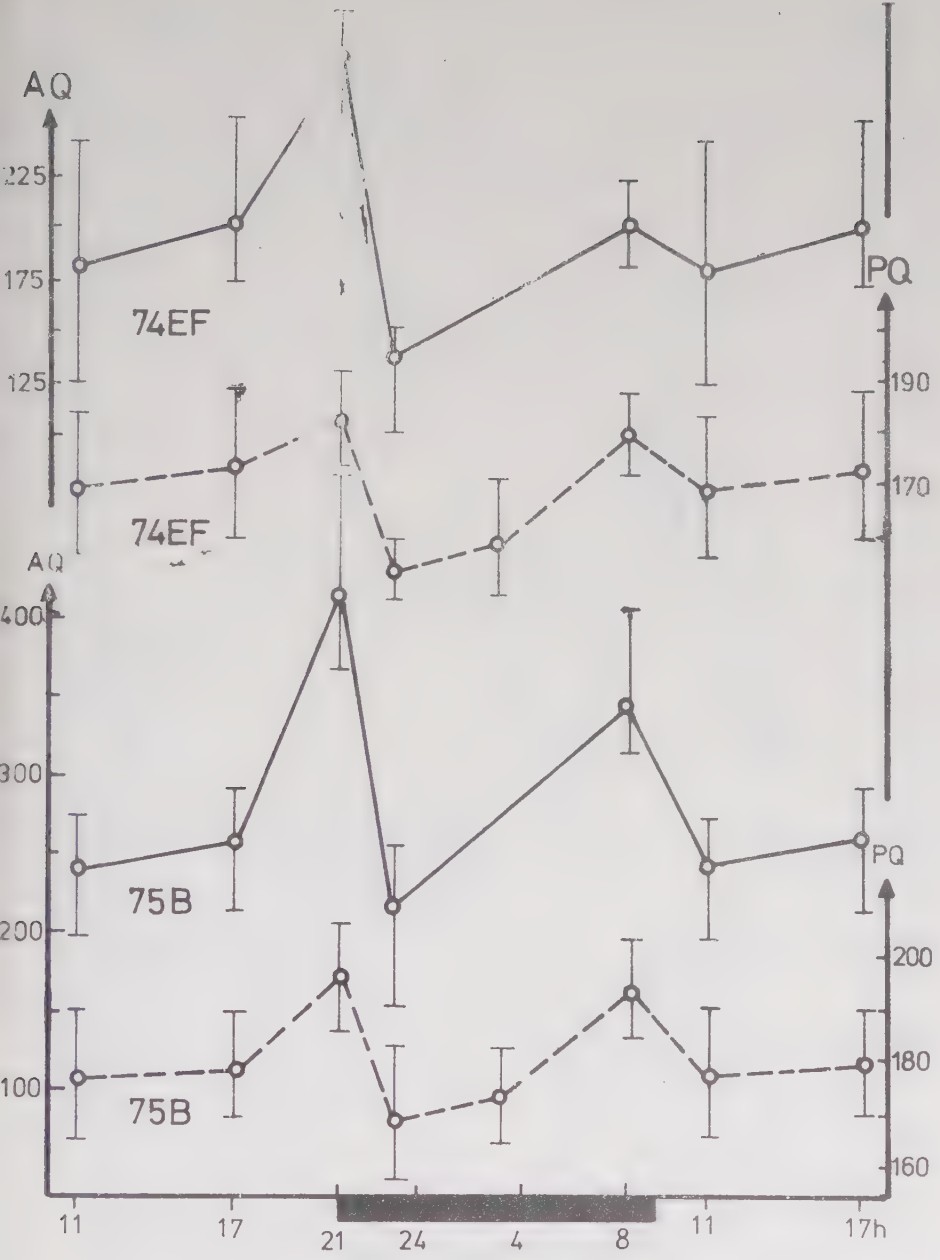
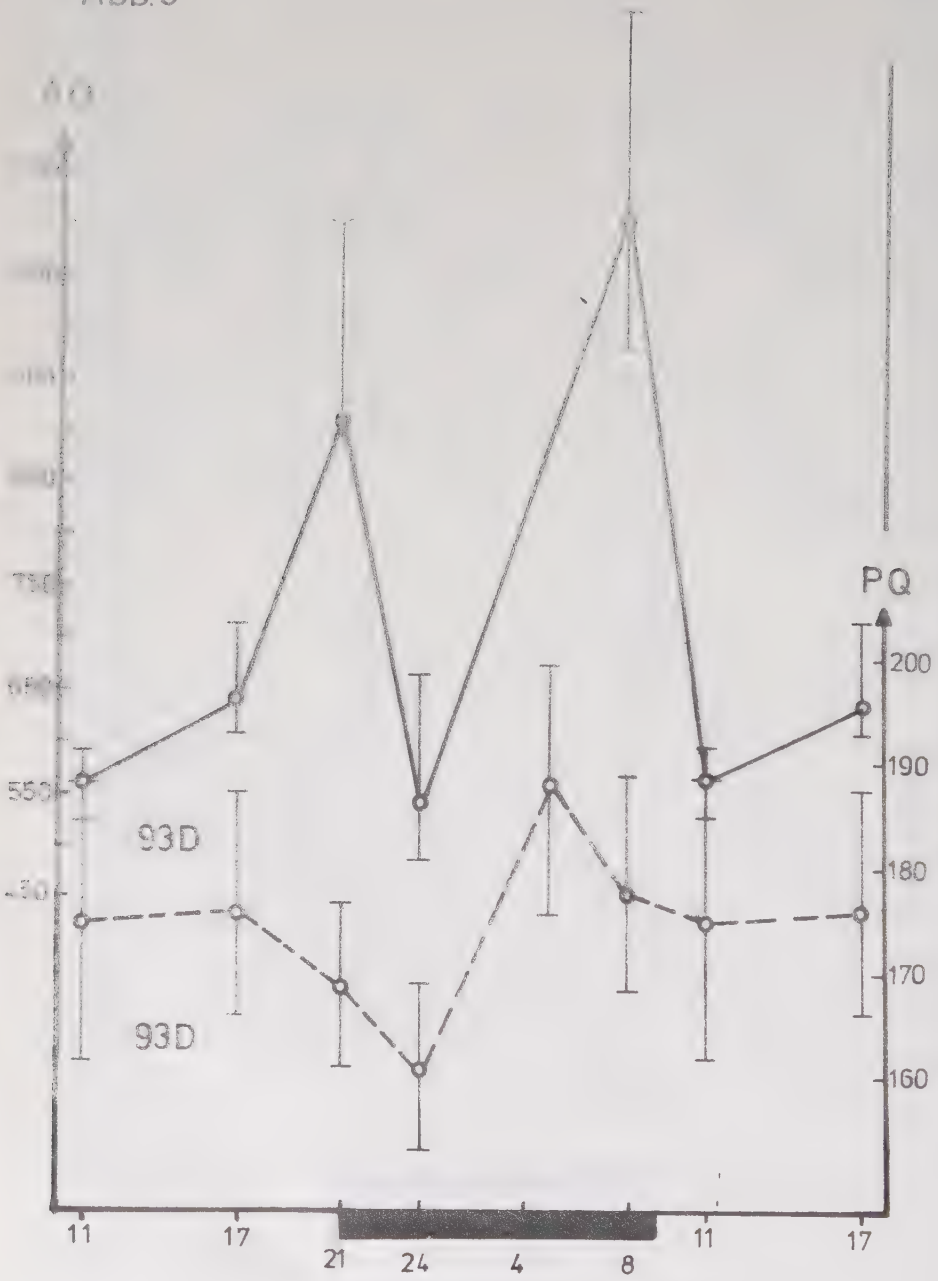
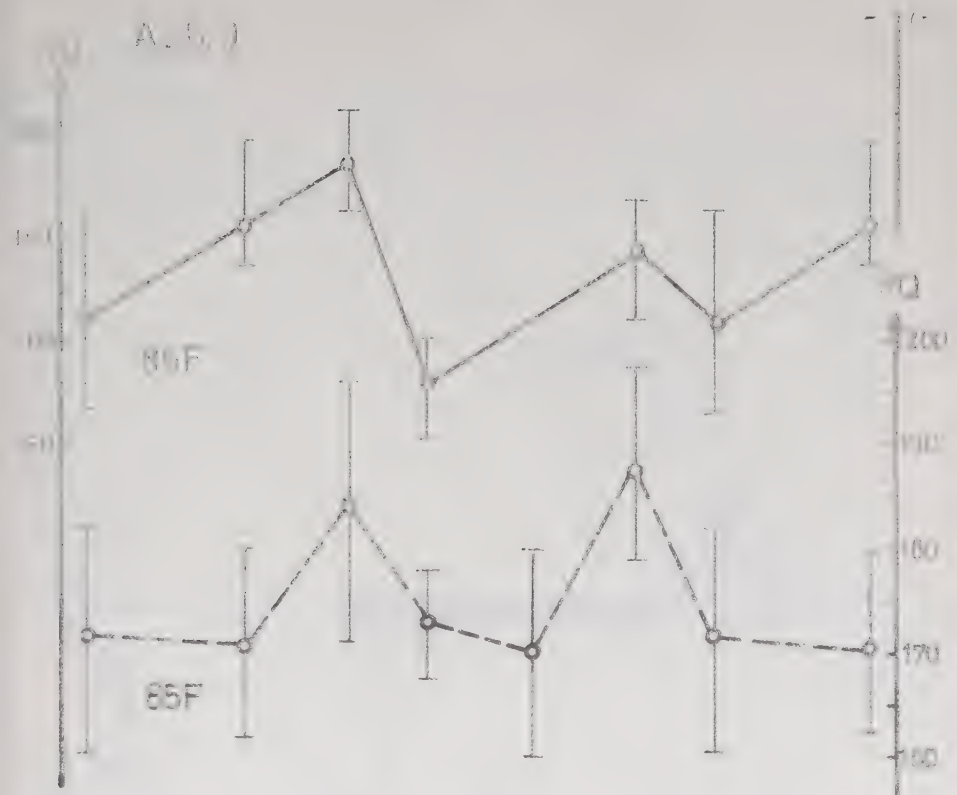
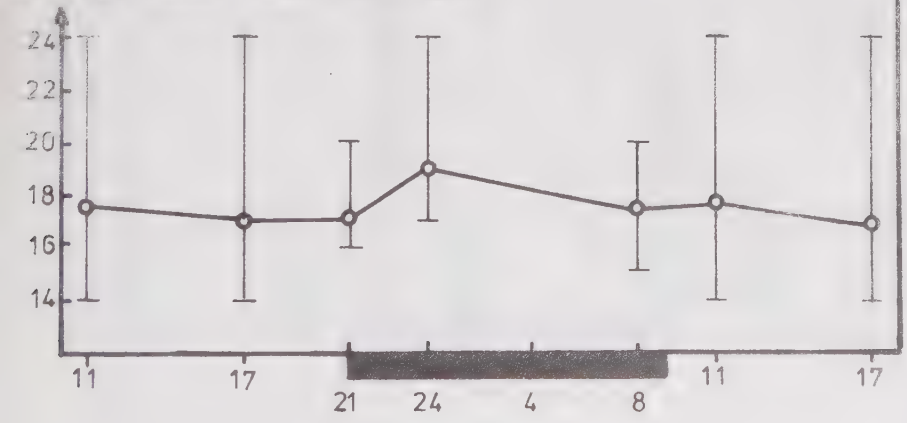

AQ
225
175
125
74EF
74EF
PQ
190
170
AQ
400
300
200
100
75B
75B
PQ
200
180
160
11
17
21
24
4
8
11
17h

Abb. 8





GRAINS über 58A-60F(2R)



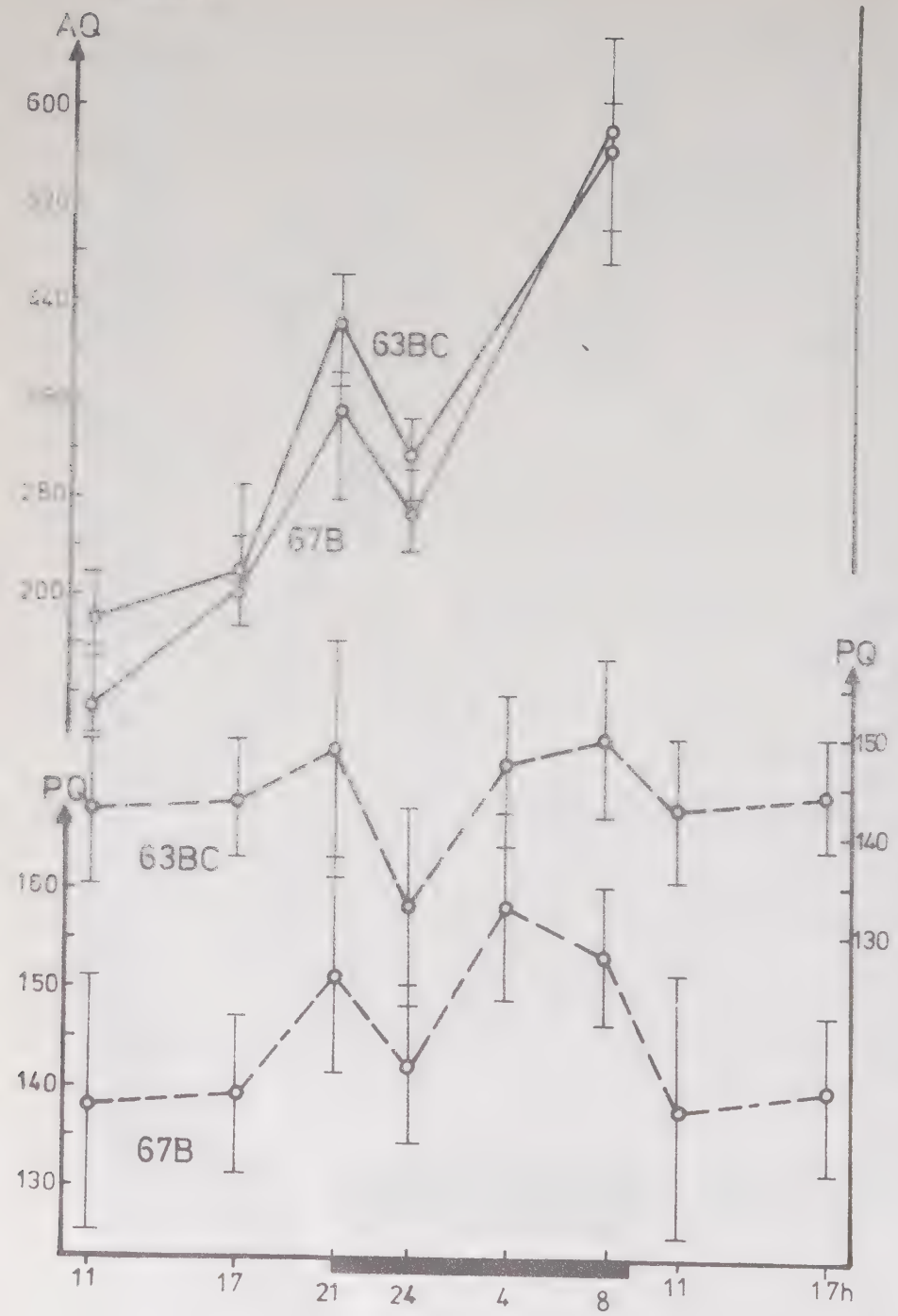
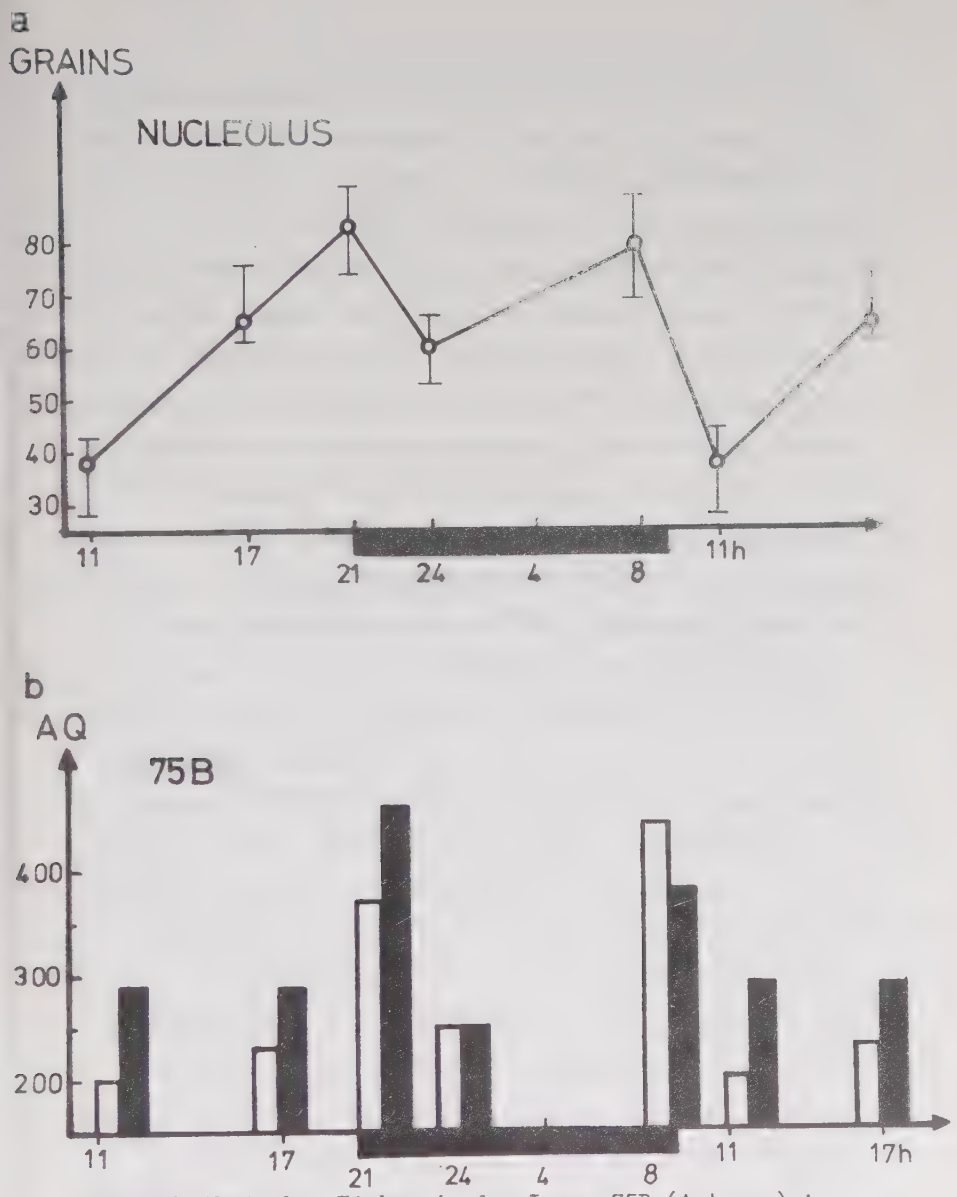

AQ
600
280
200
63BC
67B
PQ
160
150
140
130
63BC
67B
PQ
150
140
130
11
17
21
24
4
8
11
17h

Abb. 1



Tagesrhythmischer Einbau in den Locus 75B (Autosom) in XY-Drüsen (weiße Balken) und XX-Drüsen (schwarze Balken).

Steigerung der Puffvergrößerung vorangeht. Der Puff 93D (Abb. 8), der bei den Puffgrößenänderungen aus dem Rahmen fiel, reiht sich hier in die Gruppe der Puffs mit den Maxima gegen 8^{00} und 21^{00}Uhr ein : 2B5-6/13-17, 22C, 58BC/DE, 50CD, 47BC, 66E, 68C, 74EF, 75B, 85F. Die Maxima sind nicht in allen Fällen gleich hoch : 50CD um 8^{00}Uhr höher; 47BC um 21^{00}Uhr höher, 74EF und 75B um 21^{00}Uhr höher, 93D um 8^{00}Uhr höher. Eine Ausnahme stellt der Puff 47A dar (Abb. 5), dem ein Maximum gegen 8^{00}Uhr fehlt. Die Darstellung der Puffs 63BC und 67B aus der Klasse der hitzeinduzierbaren Puffs (Abb. 10) bedarf einer zusätzlichen Erklärung. Ich habe darauf verzichtet, die Werte für 11^{00} und 17^{00}Uhr nochmals einzutragen, da die fortlaufende Steigerung der RNA-Synthese nur kurzfristig gegen 24^{00}Uhr vermindert wird. Man darf wohl annehmen, daß hier die Faktoren Rhythmus und Induktion gemeinsam die RNA-Synthese beeinflussen. Schließlich sei noch die Region 3A6-3C2 auf dem X-Chromosom erwähnt, die augenscheinlich für genetisch manifeste Rhythmusänderungen verantwortlich ist (KONOPKA und BENZER, 1971). In dieser Region ist kein Puff nachweisbar, doch ändert sich die Markierung im Laufe des Tages signifikant. Diese Veränderungen können wohl als Ursache eine kurzfristige Anlagerung und die Abwanderung der DNA-ähnlichen RNA als Ursache haben. Es ist dann aber verwunderlich, daß der Markierungsgipfel im Gegensatz zu anderen Regionen gegen 17^{00}Uhr liegt und die [illegible] keine [illegible] signifikanten Änderungen

Änderungen des Puffmusters, so etwa das Auftreten spezifischer Puffs zu bestimmten Tageszeiten, konnten nicht festgestellt werden. Der Nucleolus folgt dem Synthesemuster der Puffs, obwohl die Synthese seiner RNA in der Dunkelperiode nicht so eingeschränkt wird. Schließlich sei noch auf ein Phänomen hingewiesen (Abb. 11b, Seite 19), daß aber hier statistisch nicht hinreichend abgesichert werden konnte. Nach Befunden von RENSING (1966a) ist der O_2-Verbrauch der Männchen zu Beginn der Dunkelzeit geringer als der der Weibchen, während es bei Beginn der Hellzeit genau umgekehrt ist. Eine ähnliche Situation ergibt sich bei der RNA-Synthes In den Puffs der Autosomen wird in XX-Speicheldrüsen gegen 21^{00} Uhr (Licht aus) und in den XY-Speicheldrüsen gegen 8^{00} Uhr (kurz vor Licht an) mehr RNA synthetisiert.

C. Diskussion

Die RNA-Syntheserhythmik, die Puffgrößen- und Kerngrößenrhythmik in vitro und auch die Befunde an Einzellern weisen darauf hin, daß die circadiane Organisation der Zelle ihren Ursprung in spezifischen zellulären Aktivitäten hat (ANDREWS und FOLK, 1964 ; RENSING, 1969 ; EHRET und WILLE, 1970 ; VAN DEN DRIESSCHE, 1971 ; HARDELAND, 1973). Ob dem Kern dabei eine steuernde Funktion zukommt (KARAKASHIAN und HASTINGS, 1963 ; SCHWEIGER und Mitarb. 1964), oder ob er nur die Voraussetzungen für einen cytoplasmatischen Oscillator synthesiert wie Befunde der Aktivität an kernlosen Acetabularien

(VANDEN DRIESSCHE, 1970) und an Trockensamen (BRYANT, 1973) andeuten, ist ungeklärt. Man könnte annehmen, daß bestimmte Kernprozesse im Rahmen der Genexpression einen Einfluß auf die zelluläre Rhythmik haben, zumal die rhythmischen Eigenschaften genetisch fixiert sind (KONOPKA und BENZER, 1971). Auf der anderen Seite könnte eine rhythmische Transcription über einen cytoplasmatischen Faktor erzeugt werden, der auf die Regelmechanismen der Transcription einwirkt. Die tagesrhythmische Organisation der möglicherweise an der Transcription beteiligten Prozesse zeigt z.B. bei der Rattenleber eine zeitliche Korrelation : Die Phosphorylierung der Histone (LETNANSKY und REISINGER, 1971), das Vorkommen stark markierter saurer Proteine (RZEPKA, 1973), die Aktivität der RNA-Polymerase II (GLASSER und SPELSBERG, 1972), die RNA-Synthese der 45°C und 65°C Fraktion (DÖRING und RENSING, 1973), die Kernmembranpermeabilität (KITTLICK, 1970) und schließlich auch die Aktivitäten der aus der rhythmischen Translation resultierenden Enyzme (HARDELAND und Mitarb. 1973). Bei Drosophila lassen sich solche Korrelationen nur in begrenztem Umfang aufstellen. So liegen die Synthesemaxima der tagesrhythmischen RNA-Synthese bei nahezu allen Puffs gegen 8^{00} und 21^{00} Uhr. Es ist interessant, daß bei Adulten zu diesem Tageszeiten die Empfindlichkeit für Röntgenstrahlen am größten ist (RENSING, 1969). Alle untersuchten Puffs liegen in Phase; hiermit ergibt sich ein entscheidender Widerspruch zum Chrononmodell (EHRET und TRUCCO, 1967),

das sequenzartige phasenverschobene Genaktivierungen im Tagesverlauf mit anschließender Proteinbiosynthese fordert. Nur die Annahme, daß andere, sehr viel kleinere und hier nicht untersuchte Puffs diese Funktion dennoch ausführen können und der Hinweis auf die Rhythmusregion (KONOPKA und BENZER, 1971), deren Markierungsmaximum 4 Std vor dem RNA-Synthesemaximum liegt, könnten das Chrononmodell noch rechtfertigen.

Zum Zeitpunkt maximaler RNA-Synthese läßt sich bei einigen Puffs eine signifikante Puffvergößerung nachweisen. Dieses Phänomen ist verstädnlich, wenn man bedenkt, daß die Puffgröße von der RNA-Syntheserate abhängig ist (siehe Teil I dieser Arbeit) und die RNA in den Puff akkumuliert, da sie dort für einige Zeit verbleibt (BERENDES, 1969). Der Abtransport der RNA nach Koppelung an ein Protein (Informosomenmodell, HENSHAW, 1968 ; STEVENS und SWIFT, 1966 ; FRANKE und SCHEER, 1970) erfordert den Einstrom von Proteinen. Der Kern quillt deshalb und vielleicht auch durch das eingeschleppte Hydratwasser auf : Das Maximum des Kernvolumens liegt bei 10-14^{00} und 22-24^{00}Uhr. Diese Rhythmik wird durch α-Amanitin (NÖDING und RENSING, 1973) unterbunden, so daß man annehmen muß, daß auch die synthetisierte RNA bei der Kernvergrößerung eine Rolle spielt (RENSING, 1969). Das Markierungsmaximum der cytoplasmatischen RNA schließlich liegt etwa zur gleichen Zeit des maximalen Kernvolumens : 9-12^{00} und 24^{00}Uhr (PROBECK und RENSING, 1973).

Diese Befunde ermöglichen aber nicht die Lokalisierung des primären Oscillators, da die beschriebenen Prozesse untereinander gekoppelt sind und diser daher in den verschiedenen zellulären Bereichen realisiert sein kann. Es ist denkbar, daß die Rhythmik der RNA-Polymerase (GLASSER und SPELSBERG, 1972), gekoppelt mit bestimmten cytoplasmatischen Aktivatoren (HARDIN und Mitarb. 1972), den Grundrhtyhmus erzeugt. Ebenso aber könnten chromosomale Prozesse wie die Histonphosphorylierung und die Anlagerung saurer Proteine (LETNANSKY und REISINGER, 1971 ; RZEPKA, 1973) die DNA rhythmisch dereprimieren. Die Rhythmik der Polymerase II wäre dann nur sekundär. Die Einlagerung saurer Proteine ist ein wichtiger Prozeß bei der Puffaktivierung (BERENDES, 1971; Zusf.). Hierbei kann auch dem Informationstransfer Nucleus-Cytoplasma und vice versa über tagesrhythmisch sich ändernde Kernmembranpermeabiliten (KITTLICK, 1970 ; DÖRING und RENSING, 1973) eine Bedeutung zu kommen. Es besteht die Möglichkeit, daß der Aktivator- bzw Repressor-Einstrom so tagesrhythmisch gesteuert wird, daß ein zellulärer Grundrhythmus möglich wird.

Zum anderen kann man annehmen, daß es sich hier immer nur um sekundäre tagesrhythmische Prozesse handelt, die an einen im Cytoplasma liegenden primären Oscillator gekoppelt sind. Bei Hemmung von Transcription und Translation wäre dann ein Grundrhythmus möglich, der durch ein schwingendes, selbst- [illegible] erzeugt wird, wie es unter

bei Acetabularia (VANDEN DRIESSCHE, 1970) und Trockensamen (BRYANT, 1973) der Fall ist.

Eine Reihe cytoplasmatischer Prozesse zeigen einen rhythmischen Tagesgang : Etwa die Anzahl der freien und gebundenen Ribosomen (FISHMAN und Mitarb. 1969 ; DIEMINGER, 1973), die Proteinsyntheserate (LEBOUTON und HANDLER, 1970 ; BECKMANN, 1972 ; HARDELAND und Mitarb. Zusf. 1973) und die Konzentrationen bestimmter Aminosäure im Zellpool (EHRHARDT, 1973). Eingriffe in diesen Stoffwechsel haben deutliche Genaktivierungen zur Folge (siehe Teil I dieser Arbeit, DÖRING und RENSING, 1973). Es gibt eine Anzahl weiterer Prozesse, die Genaktivierungen erzeugen, so etwa Veränderungen im Atmungsstoffwechsel nach Hitzeschock, Anaerobiose, DNP usw (RITOSSA 1962,1963 ; ELLGAARD, 1968,1972 ; ASHBURNER, 1970 u.a.) und deren Rhythmik eine Rhythmik der Transcription herstellen könnten. Selbst Änderungen der Zellmembranpermeabilität und damit Änderungen der ionalen Zusammensetzung des Cytoplasmas sind in der Lage Genaktivitäten zu ändern (KROEGER, 1967).

Zudem kann der primäre Oscillator über Enzymaktivitäten realisiert werden. Ein Modell für diese Vorstellungen ist der Glycolyseoscillator (BETZ, 1968).

Es kann an dieser Stelle nicht entschieden werden, ob der selbsterregte, primäre Oscillator im Cytoplasma oder im Kern liegt. Beide Möglichkeiten sind denkbar und können re-

alisiert sein. Diese Frage wird sich vielleicht nur dann lösen lassen, wenn man die zu Rhythmen befähigten Kompartimente der Zelle isoliert und prüft, ob ihre Stoffwechselprozesse in vitro rhythmisch weiterlaufen oder nicht. Ein anderer Weg wäre noch die Untersuchung rhythmischer Mutanten, wie sie KONOPKA und BENZER (1971) gefunden haben.

D. Zusammenfassung

1. Der Rhythmus des Kernvolumens von in vitro inkubierten Speicheldrüsen bleibt auch im geänderten Medium erhalten. Bei einem Licht-Dunkel-Wechsel von 9-21^{00}Uhr hell und 21-9^{00}Uhr dunkel liegen die Maxima gegen 10-14^{00} und 22-24^{00}Uhr.
2. Die Puffgröße unterliegt ebenso wie der Kern bimodalen Grössenschwankungen. Der Unterschied im Puffdurchmesser ist jedoch nur bei größeren Puffs signifikant. Die übrigen Puffs weisen aber in der Tendenz ihrer Größenänderungen die gleichen Rhythmen wie die größeren Puffs auf. Die Maxima liegen gegen 8^{00}Uhr (kurz vor Licht an) und 21^{00}Uhr (Licht aus).
3. Die RNA-Synthese in den Puffs zeigt gegen 21^{00}Uhr und 8^{00} Uhr ihr Maximum. Sie induziert damit offenbar die Größenschwankungen der Puffgröße und des Kernvolumens, deren Maxima zeitgleich oder etwas später auftreten.
4. Die Rhythmusregion 3 A6-3 C2 zeigt signifikante Markierungsänderungen, obwohl ein Puff in dieser Region fehlt. Eine andere Region (58A-60F) zeigt derartige Änderungen nicht. Das Markierungsmaximum liegt 4 Std phasenverschoben vor dem Synthesemaximum der RNA in den Puffs.
5. Der Nucleolus zeigt wie die Puffs Änderungen seiner Syntheseaktivität.
6. Befunde über die unterschiedliche Ausprägung von Morgen- und Abendmaxima bei Männchen und Weibchen konnten tendenzmäßig im Rahmen der RNA-Synthese bestätigt werden.

E. Literaturverzeichnis

ANDREWS, R.V. und G.E.Jr. FOLK (1964): Circadian metabolic pattern in cultured hàmster adrenal glands. Comp.Biochem. Physiol. 11, 393-409

ASHBURNER, M. (1970): Patterns of puffing activity in the salivary gland chromosomes of Drosophila V. Responses to invironmental treatments. Chromosoma 27, 47-63

ASHBURNER, M. (1972): Puffing patterns in Drosophila mel. and related species. Aus: Developmental studies on giant chromosomes. Hrsg. W.Beermann, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1972 101-151

BECKMANN, J. (1972) unveröffentlicht

BERENDES, H.D. (1969): Induction and control of puffing. Ann. Embryol. Morphogen. Suppl. 1, 153-164

BERENDES, H.D. (1971): Gene activation in dipteran polytene chromosomes. Symp. Soc. Exp.Biol. XXV, 145-161

BETZ, A. (1968): aus"Quantitative Biology of Metabolism", Hersg. A.Locker, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

BRIDGES, C.B. und E.S. BREHME (1944): The mutants of Drosophila melanogaster. Carnegie Inst. of Washington, Publ. 552, 256

BRYANT, T.R. (1972): Gas exchange in dry seeds : circadian rhythmicity in the absence of DNA replication, transcription and translation. Science 178, 634

DIEMINGER, L. (1973) : im Druck

DÖRING R. und L. RENSING (1973): Circadian rhythm of different RNA-fractions in rat liver und the effect of cycloheximid. Comp. Biochem.Physiol. 45B, 285-290

EHRET C. und E. TRUCCO (1967): Molecular models for the circadian clock.I. The chronon concept. J. theor. Biol. 15, 240-262

EHRET, C. und J.J. WILLE (1970): aus " Photobiology of Micr organisms ". P.Halldal (Hrsg) John Wiley, New York, London 1970

EHRHARDT, V. (1973): in Vorbereitung

ELLGAARD, E.G. (1968): An analysis of puff formation und regression in polytene chromosomes of Drosophila melanogaster. Ph.D.Thesis, University of Texas

ELLGAARD, E.G. (1972): Similarities in chromosomal puffing induced by temperature shock and DNP in Drosophila. Chromosoma 37, 412-422

FISHMAN, B. , R.J. WURTMAN und H.N. MUNRO (1969): Daily rhythms in hepatic polysome profiles and tyrosine transaminase activity: Role of dietary protein. Proc. Natl.Acad.Sci.US 64, 677-682

FRANKE, W.W. und U.SCHEER (1970): The ultrastructure of the nuclear envelope of amphibian oocytes:A reinvestigation. J. Ultrastruc. Res. 37, 288-316

GLASSER, S.R. und T.C. SPELSBERG (1972): Mammalian RNA polymerases I and II: independent diurnal variations in activity. Biochem. Biophys. Res. Comm. 47, 951-958

HARDELAND,R. und G. STANGE (1971): Einflüsse von Geschlecht und Alter auf die lokomotorische Aktivität von Drosophila. J. Insect Physiol. 17, 427-434

HARDELAND, R. (1972): Circadian rhythmicity of tyrosine aminotransferase activity in suspensions of isolated rat liver cells. J. interdiscp.Cycle Res. 3, 1o9-114.

HARDELAND, R. , D.HOHMANN und L.RENSING (1973): The rhythmic organisation of rodent liver. A review. J. interdisc. Cycle Res.:im Druck

HARDIN, J.W. , J.H. CHERRY , D.J. MORRE´und C.A.LEMBI (1972): Proc. Natl. Acad. Sci.US, 69, 3146-3150

HENSHAW , E.C. (1968): Messenger RNA in rat liver polyribosomes: evidence that its exists as RNP-particles. J. Mol.Biol. 36, 401-411

KARAKASHIAN, M.W. und J.W. HASTINGS (1963): The effects of inhibitors upon macromolecular biosynthesis upon the persistent rhythm of luminescens in Gonyaulax. J. gen. Physiol. 47, 1-12

KITTLICK, P.D. (1970): Untersuchungen über die tageszeitliche Änderung der Kernmembranpermeabilität von Rattenleberzellkernen. Exp.Path. 4, 143-154

KONOPKA, R.J. und S. BENZER (1971): Clock mutants of Drosophila melanogaster. Proc. Natl.Acad. Sci.US 68 ,2112-2116

KROEGER, H. (1967): Hormones, ion balances and gene activity. Mem.Soc.Endocrin. 15, 55-66

LEBOUTON, A.V. und S.D. HANDLER (1970): Diurnal incorporation of ^{3}H-leucine into liver protein. FEBS letters 10, 78-80

LETNANSKY, K. und L. REISINGER (1971): Circadian rhytms in the phosphorylation of rat liver histones and similar basic proteins. Biochem. Biophys. Res. Comm. 49, 312-320

NÖDING D. und L. RENSING (1973) : unveröffentlicht

PITTENDRIGH, C.S. (1966): The circadian oscillation in Drosophila pseudoobscura pupae: a model for the photoperiodic clock. Z. Pflanzenphysiol. 54, 275-307.

PROBECK, H.D. und L. RENSING (1973): in Vorbereitung

RENSING, L. (1966a):Zur circadianen Rhythmik des Sauerstoffverbrauches von Drosophila. Z. vergl. Physiol. 53, 62-63

RENSING, L. (1966b) : Neuere Ergebnisse zur Cytologie, Biochemie und Zellphysiologie circadianer Rhythmen. Nachr. Acad. Wiss. Göttingen, Math.-Phys. Klasse 103-105

RENSING, L. (1969): Circadiane Rhythmik von Drosophila Speicheldrüsen in vivo, in vitro und nach Ecdysonzugabe. J. Insect Physiol. 15, 2285-2303

RENSING, L. (1969): Ein circadianer Rhythmus der Empfindlichkeit gegen Röntgenstrahlen bei Drosophila, Z. vergl. Physiol. 62, 214-220

RENSING, L. und R. HARDELAND (1967): Zur Wirkung der circadianen Rhythmik auf die Entwicklung von Drosophila. J. Insect Physiol. 13, 1547-1568

RENSING, L. , W. BRUNKEN und R. HARDELAND (1968): On the genetics of a circadian rhythm in Drosophila. Experientia 24, 509-510

RITOSSA, F. (1962): A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in Drosophila. Experientia 18, 571-573

RITOSSA, F. (1963): New puffs induced by temperature shock, DNP and salicylate in salivary gland chromosomes of Drosophila melanogaster. Dros. Inf. Serv. 37, 122-123

RZEPKA, P. (1973) : in Vorbereitung

SCHWEIGER, E. ; WALLRAFF, H.G. und H.G. SCHWEIGER (1964): Endogenous circadian rhythms in cytoplasm of Acetabularia : influence of the nucleus. Science 146, 658-659

STEVENS, B.J. und H. SWIFT (1966): RNA-transport from the nucleus to cytoplasma in Chironomus salivary glands. J. Cell Biol. 31, 55-77

VANDEN DRIESSCHE, T. (1970): Les rhythmes circadiens chez les unicellulaires. J. interdiscipl. Cycle Res. 1, 21

VANDEN DRIESSCHE, T. (1971): Possible diversity in basic mechanisms of biological oscillations. J. interdiscipl. Cycle Res. 2, 133-145

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Rensing für die gemeinsamen Diskussionen und Veröffentlichungen über das vorliegende Fachgebiet und die Möglichkeiten zu selbständiger wissenschaftlicher Arbeit.

Ich danke Herrn Prof. Dr. BERENDES und seinen Mitarbeitern (Nijmegen, Niederlande) für eine Einführung in die autoradiographische Technik, die mir unnötigen Arbeitsaufwand erspart hat.

Lebenslauf

Am 4. Dezember 1942 wurde ich, Günther Nagel, als Sohn von August Nagel und seiner Ehefrau Liselotte, geb. von Bostel, in Hildesheim (Niedersachsen) geboren.
Ab Frühjahr 1949 besuchte ich eine Volksschule in Hildesheim und bestand 1953 die Aufnahmeprüfung für das Gymnasium Andreanum zu Hildesheim. Da mein Vater 1954 aus beruflichen Gründen nach Osterode/ Harz versetzt wurde, besuchte ich das dortige Gymnasium bis zu meinem Abitur. Nach anfänglichen Schwierigkeiten (ich wurde in der Klasse 7 nicht versetzt), bestand ich das Abitur im Jahre 1963.
Im Anschluß an diese Zeit diente ich zwei Jahre als Freiwilliger bei der Bundeswehr und wurde 1965 als Leutnant der Reserve entlassen. Ich begann dann das Studium in den Fächern Biologie und Chemie mit der Absicht Lehrer zu werden. Im Jahre 1967 bestand ich die Vorprüfung und begann 1969 mit meiner Staatsexamenarbeit bei Prof. Dr. L. Rensing. Im Verlauf dieser Arbeit (auch über Riesenchromosomen) wuchs mein Interesse an einer Weiterarbeit über dieses Spezialgebiet und unter dem Einfluß von Herrn Rensing entschied ich mich, nach meiner Prüfung weiterzuarbeiten.
Im Sommer 1970 bestand ich dann das Staatsexamen und die Diplomprüfung. Nach anfänglichen finanziellen Schwierigkeiten begann ich 1971 mit meiner Doktorarbeit, die ich im Sommer dieses Jahres abgeschlossen habe.